



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Genotoxicidad inducida por la exposición a dióxido de titanio grado alimenticio (E171) en células de cáncer colorrectal

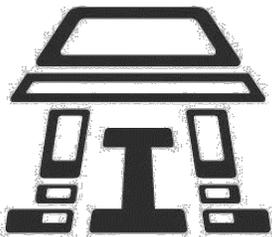
Tesis que para obtener el título de
Bióloga

PRESENTA

Carolina Rodríguez Ibarra

Directora de Tesis

Dra. Yolanda Irasema Chirino López





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dicen que el hogar es donde te enseñaron a ser tú mismo, respetando tus decisiones y tu forma de pensar y de sentir. He tenido dos hogares maravillosos los cuales han sido parte fundamental de mi desarrollo personal y académico.

A mis papás Lulú y Juan Manuel, que siempre me han apoyado incondicionalmente y cuyo amor es inmenso. Que me han enseñado a ser yo misma, que nunca me han exigido ser alguien que no soy. Gracias por ayudarme a levantarme las veces que han sido necesarias, gracias por nunca irse de mi lado y por darme su vida entera. Un millón de gracias por enseñarme a ser fuerte sin perderme en el camino, por no dejarme desistir. Ustedes son mi ejemplo, mi motivación y mi orgullo.

A la Dra. Irasema que ha sido mi guía y un ejemplo a seguir en muchos los aspectos de la vida, quien me ha apoyado con una enorme paciencia. Gracias por dejarme ser parte de esta disfuncional pero hermosa familia y por enseñarme a cerrar círculos. Aristóteles dijo que *“En definitiva, lo que distingue al sabio del ignorante es el poder enseñar”*, usted es una sabia. Espero compartir con usted el camino de la ciencia muchos años más.

A Isha, mi mejor amiga, mi compañera en todo momento. Gracias por nunca juzgarme, por entenderme y estar ahí siempre que te he necesitado, eres verdaderamente mi hermana. A mis amigos de Acapulco, en especial Gustavo, Brenda, Poncho, Laila y Abril, saben que los quiero inmensamente y que siempre han sido mi gran apoyo, los buenos momentos con ustedes me han ayudado a salir adelante.

A Marisol, Michelle, Carmen, Chan, Richie, Alan, Cristian, Manuel, Caro, Adrián y Javier que me han enseñado mucho sobre la vida, sobre la ciencia y sobre la biología, que se han mantenido a mi lado a pesar de todo y que me han apoyado todo el tiempo, me faltan palabras para decirles cuánto los quiero y cuánto aprecio todos nuestros recuerdos juntos. Iván, me enseñaste que uno de los grandes sentidos de la biología es adquirir conocimiento de la vida, me enseñaste a amar mi carrera y junto a todos los anteriores, siempre estarán en mi corazón.

A los profesores que durante toda la carrera me enseñaron a amar la biología y el verdadero significado de hacer ciencia. Gracias Hibrain por todos tus consejos y apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio quienes me han enseñado con el ejemplo lo que es el trabajo duro y el esfuerzo que se necesita para conseguir tus metas y quienes nunca se negaron a darme una mano cuando lo necesitaba, ustedes han sido mi segunda familia, gracias por todo. En especial a la Dra. Norma, Memo, Isma, Alex y Kevin quienes nunca lo han pensado dos veces para ayudarme y con quienes tengo muy buenos recuerdos.

A Ingrid y Laura quienes me han apoyado en todo momento quienes además de ser mis compañeras de laboratorio son unas excelentes amigas, gracias por tanto, me han enseñado a salir adelante frente a las adversidades y a valorar todo en mi vida. Las quiero con el alma.

Tengo mucho que agradecer a todos ustedes que han formado parte de mi vida. Y tengo la promesa de que nunca me daré por vencida, que siempre pondré un pie en frente de otro a pesar del mal tiempo y que nunca dejaré de ser yo misma, como todos ustedes me han enseñado.

Esta tesis se las dedico a todos ustedes, los quiero infinitamente.

"Existe al menos un rincón del universo que con toda seguridad puedes mejorar, y eres tú mismo."

Aldous Huxley.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB-2011/166727) y la beca de titulación No. 23173 emitida por la misma institución.

Quiero agradecer a la UNAM por haberme dado la oportunidad de desarrollarme académica y personalmente dentro de sus aulas y por brindar espacio y recursos para realizar esta tesis.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Manuel Arias por brindarme su apoyo académico y reactivos necesarios durante la realización de este trabajo de tesis. También a la Dra. Norma por su apoyo académico. Además, a mis revisores el Dr. Felipe Vaca, la Dra. Alina Uribe, la Dra. Ana María García y la Dra. María Eugenia Gonsebatt los cuales me brindaron su apoyo y consejos durante la realización de este trabajo de tesis.

COMISIÓN DICTAMINADORA

Presidente: Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Vocal: Dr. Felipe Vaca Paniagua

Secretario: Dra. Yolanda Irasema Chirino Lopez

Suplente: Mtra. Alina Uribe García

Suplente: Dra. Maria García Bores

Tlalnepantla de Baz, 2016.

RESUMEN

Antecedentes: El dióxido de titanio grado alimenticio (E171) es ampliamente utilizado como aditivo en alimentos para dar color blanco y opacidad. Se encuentra en lácteos, dulces y repostería, además está presente en pastas dentales y en productos farmacéuticos por lo que la población en general está altamente expuesta a este aditivo por vía oral.

A pesar de que se conocen algunos efectos tóxicos del dióxido de titanio por vía inhalatoria y oral, la información sobre el E171 es muy limitada. Se sabe que el E171 es internalizado y acumulado en células de colon, sin embargo, no se han estudiado los efectos genotóxicos del E171 en el este tejido, ni los mecanismos por los cuales podría causar daño al DNA; por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el daño a DNA por la exposición en el colon de ratones sanos alimentados con E171 por 4 y 10 semanas. Además, para estudiar el mecanismo de este daño, se determinó la formación de micronúcleos (MN) en células de cáncer colorrectal (HCT116) expuestas a E171 durante 24 horas, y de manera acelular, se evaluó la capacidad fotocatalítica del E171 y el daño directo a DNA plasmídico inducido por la exposición a E171.

Método: Se administró E171 por medio del alimento (0.5% del peso total del alimento) a ratones sanos y se evaluaron las rupturas de doble cadena en el DNA, además se evaluó el daño genotóxico por medio del ensayo de MN en concentraciones no citotóxicas en células HCT116 de cáncer colorrectal. Se evaluó la capacidad fotocatalítica del E171 por medio del ensayo de degradación de azul de metileno (AM), además de evaluar el efecto que tiene la incubación del E171 con proteínas como suero fetal bovino (SFB) y albúmina en la capacidad fotocatalítica del mismo. Finalmente, para determinar si el E171 podría tener interacción directa con el DNA, se realizó un ensayo de degradación de DNA plasmídico.

Resultados: El daño al DNA en el colon de ratones alimentados con 0.5% de E171 a las 4 semanas se incrementó 3 veces en comparación al control y esto se mantuvo a las 10 semanas de tratamiento. Por otra parte, las concentraciones de 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171, no son citotóxicas para las células HCT116 por lo que fueron utilizadas para el ensayo de MN. El número de MN en células HCT116 expuestas a E171 aumentó 1.9,

2.4 y 3.6 veces con las concentraciones de 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente, los MN en la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no pudieron ser contados debido a la interferencia de los aglomerados de E171 en la interpretación de los resultados. En los ensayos acelulares, se encontró que el E171 tiene capacidad fotocatalítica contrario a lo anteriormente reportado, además, esta se ve reducida 5.6 y 2.4 veces al ser incubado con SFB y 0.1% de albúmina respectivamente. Al exponer DNA plasmídico a distintas concentraciones de E171, el DNA cambia de la forma super enrollada a circular de una manera dosis dependiente, lo que indica la generación de ruptura de cadena sencilla

Conclusión: El E171 causa genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* en colon. Esto se ve en un aumento de 3 veces de rupturas de doble cadena en tejido de colon de ratones al ser administrado a través de la dieta y de forma *in vitro* se observa en la inducción de la formación de MN, en células de cáncer colorrectal, de manera concentración dependiente. El E171 posee actividad fotocatalítica la cual se ve reducida al recubrir las partículas con SFB y albúmina del medio. Finalmente, el E171, puede causar rupturas de doble cadena en un modelo acelular de degradación de DNA plasmídico.

ABREVIACIONES

AM Azul de metileno	Internacional de Investigación para el cáncer
ATCC Del inglés American Type Culture Collection: Colección Americana de Cultivos	Kg_{bw} Del inglés body weight: Kilogramo de peso corporal
CBMN Células binucleadas con micronúcleos	MMR Del inglés Mismatch Repair: Sistema de reparación de desapareamiento de bases
CCR Cáncer colorrectal	MN Micronúcleos
CIN Inestabilidad cromosómica	NHEJ Del inglés Non homologous end joining: recombinación no homóloga
E171 Dióxido de titanio grado alimenticio	NM Nanomateriales
EPA Del inglés Environmental Protection Agency: Agencia de protección al Ambiente de Estados Unidos	NP Nanopartícula
FAP Poliposis adenomatosa familiar	NPs Nanopartículas
FDA Del inglés Food and Drug Administration: Administración de Medicamentos y Alimentos	OECD Del inglés Organisation for Economic Co-operation and Development: Organización para la cooperación económica y el desarrollo
HBSS Del inglés Hanks Balanced Salt Solution: Solución salina de Hanks	ROS Especies reactivas de oxígeno
HNPCC Cáncer colorrectal hereditario no polipósico	SFB Suero fetal bovino
HR Del inglés Homologous recombination: recombinación homóloga	TiO₂ Dióxido de titanio
IARC Del inglés International Agency for Research on Cancer: Agencia	TiO₂ NPs Nanopartículas de dióxido de titanio
	TiO₂-B Cintas de dióxido de titanio
	TiO₂-S Esferas de dióxido de titanio
	UV Luz ultravioleta
	γH2AX Histona fosforilada H2AX

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Nanomateriales, definición y clasificación	11
1.2 Genotoxicidad inducida por exposición a nanomateriales	14
1.3 Nanopartículas de dióxido de titanio	16
1.4 El dióxido de titanio como aditivo en los alimentos (E171)	18
1.5 Efecto de las nanopartículas de dióxido de titanio en distintos modelos experimentales del tracto gastrointestinal	20
1.6 Genotoxicidad por exposición a nanopartículas de dióxido de titanio	23
1.5 Riesgos en el tracto gastrointestinal por el consumo de E171	25
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPÓTESIS	29
4 OBJETIVO GENERAL	29
4.1 Objetivos particulares	29
5 MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Exposición a E171 en un modelo murino	30
5.2 Obtención y procesamiento del tejido de colon	30
5.3 Inmunofluorescencia de γ H2AX	31
5.4 Cultivo celular de la línea HCT116 de cáncer colorrectal	32
5.5 Exposición a E171 en el modelo <i>in vitro</i>	32
5.6 Cuantificación de la viabilidad celular por azul tripano	32
5.7 Cuantificación de micronúcleos como reflejo del daño a DNA	33
5.8 Cuantificación del potencial fotocatalítico del E171	33

5.9	Ensayo de degradación de DNA plasmídico	34
5.10	Análisis estadístico	35
6	RESULTADOS	
6.1	Detección de daño a DNA por inmunofluorescencia de γ H2AX en colon de ratones alimentados con E171	37
6.2	Cuantificación de la viabilidad celular por azul tripano	39
6.3	Cuantificación de células binucleadas con micronúcleos	39
6.4	Potencial fotocatalítico del E171	41
6.5	Adsorción de azul de metileno en por E171	42
6.6	Fotocatálisis por E171 incubado con suero fetal bovino y albúmina	44
6.7	Daño a DNA plasmídico por exposición a E171	44
7	DISCUSIÓN	47
8	CONCLUSIONES	55
9	PERSPECTIVAS	56
10	REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales características que influyen en la toxicidad de una nanopartícula	14
Figura 2. Mecanismos de genotoxicidad directa e indirecta por acción de nanopartículas	15
Figura 3. Formas cristalinas del dióxido de titanio (TiO ₂) con su respectivo arreglo molecular	17
Figura 4. Microscopia electrónica de barrido de partículas de E171	18
Figura 5. Cantidad de titanio por mg de producto en diversos alimentos	19
Figura 6. Inestabilidad genómica en cáncer colorrectal	27
Figura 7. A) Imágenes de inmunofluorescencia de γ H2AX en colon de ratones expuestos a E171 B) Cuantificación de la fluorescencia de γ H2AX	37
Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular en células HCT116 expuestas a E171	39
Figura 9. Daño genotóxico en células HCT116 por exposición a E171. A) Imágenes representativas de micronúcleos (MN) en células HCT116 expuestas a E171 B) Cantidad de células binucleadas con micronúcleos	40
Figura 10. Degradación del azul de metileno por diferentes formas de TiO ₂	42
Figura 11. Adsorción de azul de metileno por E171	43
Figura 12. Degradación del azul de metileno por E171 incubado con proteínas	44
Figura 13. Degradación de DNA plasmídico por exposición a E171	45
Figura 14. Cantidad de DNA dañado por exposición a E171	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto genotóxico de distintos nanomateriales en diferentes líneas celulares	16
Tabla 2. Diferentes estudios sobre la genotoxicidad de las TiO ₂ NPs en diferentes líneas celulares	24
Tabla 3. Soluciones y tiempos utilizados para la deshidratación de los tejidos de colon para la realización de cortes histológicos.	30
Tabla 4. Soluciones y tiempos utilizados para la hidratación de los cortes de colon.	31

1. Introducción

1.1 Nanomateriales, definición y aplicaciones

Los nanomateriales (NMs) son definidos por la Unión Europea como materiales que consisten en al menos 10% de partículas con una o más dimensiones en el intervalo de 1 nm a 100 nm. Los NMs se clasifican en naturales, que son el producto de procesos como erosión y erupciones volcánicas, incidentales los cuales son generados por los humanos sin intención y son producto de procesos como combustión, por último, los NM manufacturados que son intencionalmente fabricados con características específicas para ser utilizados en un amplio espectro de aplicaciones en la medicina, la electrónica, la agricultura, el tratamiento de aguas, la industria textil, la fabricación de productos de uso personal y la industria alimenticia (EPA, 2016).

Los NMs manufacturados pueden clasificarse por su composición química y estructura física en cuatro grandes grupos según la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA):

- NMs de base de carbono
 - Son moléculas compuestas principalmente de carbón y organizadas en formas específicas como esferas huecas y tubos.
 - Son utilizados en baterías, en el cuerpo de automóviles y aviones o cohetes, y en diagnóstico médico y herramientas de imagen.
 - Ejemplos: nanotubos de carbón, nanofibras de carbón, carbon black.
- Dendrímeros
 - Son moléculas ramificadas que proveen cavidades internas para transportar otras moléculas y pueden estar funcionalizados en su superficie.
 - Son utilizados en recubrimientos, bioremedación, tintas, para contraste de imagen o incluso como medicamentos.
 - Los más comúnmente utilizados están formados por estructuras de aminas y amidas (nitrógeno, hidrógeno y carbón).

- Quantum dots
 - Son semiconductores cristalinos, usualmente de metal que al ser manipulado su tamaño puede resultar en diferentes colores fluorescentes.
 - Entre sus usos se encuentran luces de LED compuestas de quantum dots de cadmio selenio, para análisis de imagen de células y moléculas y en paneles solares.
- Con base metálica u óxido-metálica
 - Son generalmente nanopartículas (NPs) esféricas compuestas en su totalidad o en parte, de uno o dos metales. Poseen propiedades ópticas, térmicas, magnéticas, de óxido reducción y de conductividad específicas.
 - Entre sus usos se encuentra el acarreamiento de fármacos, la formación de cubiertas antibacteriales y como semiconductores en aparatos electrónicos.
 - Ejemplos: NPs de dióxido de titanio (TiO₂ NPs) en protectores solares y alimentos, NPs de plata como agentes antibacteriales y NPs de sílice utilizadas en productos de plástico.

Además de estos NM, existen otros como los nanocompuestos los cuales son NMs multifásicos donde una o más de las fases que lo componen tiene al menos una dimensión dentro de 1 a 100 nm, pueden ser orgánicos, inorgánicos o combinados. Además los nanocompuestos son utilizados en la medicina como acarreadores de fármacos, en la electrónica, en la fabricación de electrodos, en la imprenta de litografías y en la industria alimenticia (Paul *et al*, 2008). Un ejemplo de estos son los nanocompositos de almidón y arcilla utilizados en el empaquetamiento de alimentos (Romero-Bastida *et al*, 2015).

El uso de NMs ofrece gran cantidad de ventajas en las muchas aplicaciones existentes, sin embargo, hay ciertas desventajas a considerar, por ejemplo, se ha demostrado que existen riesgos para la salud de los trabajadores que manejan NMs en la industria y se encuentran expuestos por vía inhalatoria de manera crónica (Boffeta *et al*, 2014). Además, en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que algunos de estos

NMs pueden tener efectos genotóxicos, citotóxicos, carcinogénicos o pro-inflamatorios vía inhalatoria (Bakand *et al*, 2016).

Por otro lado, debido al aumento de su aplicación en la biomedicina y en productos alimenticios y de uso personal, es importante también analizar los riesgos de exposición y crear medidas de regulación para su uso (Kroll *et al*, 2009). Las investigaciones sobre la toxicidad de los NMs han crecido exponencialmente en los últimos años, lo que indica que hay una gran preocupación por sus posibles efectos sobre la salud. En especial las NPs de óxidos metálicos, que son las más fabricadas y comercializadas, por lo que es importante hacer estudios sobre su toxicidad para poder evaluar el riesgo de exposición a ellas (Piccinno *et al*, 2012).

Existen diversas características y consideraciones que afectan la toxicidad de una NP, como el tiempo y la vía de exposición, la cual puede ser oral, dérmica, inhalatoria e intravenosa. También se debe tomar en cuenta el medio de dispersión, la composición de la partícula, el tamaño de la misma, la capacidad fotocatalítica y la carga (Figura 1; Stamm *et al*, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que cuando se disminuye el tamaño de las TiO₂ NPs, el área superficial y reactiva de las mismas aumenta y se eleva su potencial para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) las que pueden tener influencia en el desarrollo de inflamación, toxicidad y enfermedades crónicas (Figura 1; Lomer *et al*, 2002; Shi *et al*, 2013; Peters *et al*, 2014). Por otro lado, la carga de las TiO₂ NPs cambia con respecto al pH del medio, a pH 10 la carga es negativa mientras que a pH 3 la carga es positiva (Jiang *et al*, 2009). Además, la estructura cristalina de una NP puede definir su capacidad fotocatalítica, lo cual está relacionado directamente con la formación de ROS. Específicamente, se sabe que en cuanto a las TiO₂ NPs, la fase anatasa es la más tóxica (Sayes *et al*, 2006).

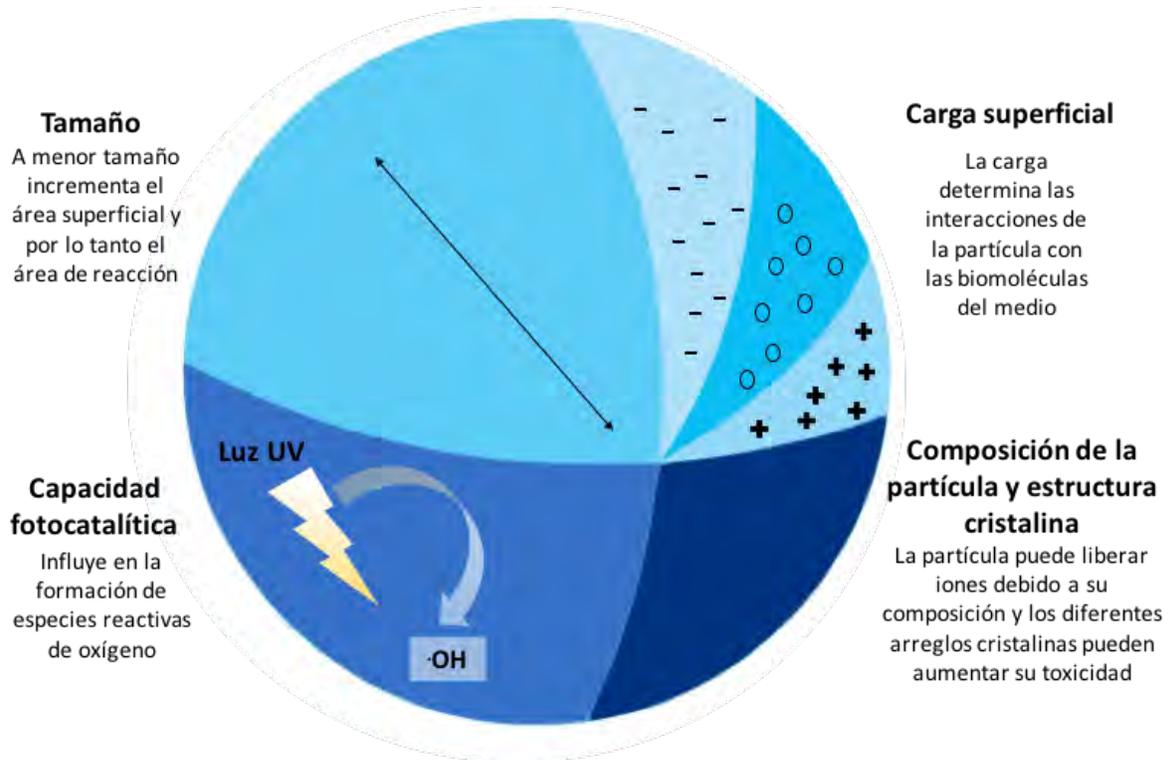


Figura 1. Principales características que influyen en la toxicidad de una NP. En la fotocatalisis ese forma el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Modificado de Borel & Sabliov, 2014.

1.2 Genotoxicidad inducida por la exposición a nanomateriales

Una parte importante de la evaluación de riesgo del uso de NMs es su capacidad para inducir citotoxicidad y genotoxicidad. La primera se refiere al daño que puede causar a nivel celular y la segunda es el daño en el DNA. Se sabe que la genotoxicidad es un paso fundamental en el inicio y desarrollo del cáncer (Lee *et al*, 2013), por lo que también se han estudiado los efectos carcinogénicos de distintos NMs (Mroz *et al*, 2008; Singh *et al*, 2009; Paino *et al*, 2012).

Existen diversos mecanismos por los que las NPs pueden ser causantes de genotoxicidad, éstos se dividen en mecanismos primarios y secundarios. Los primarios están directamente relacionados con las NPs y se dan a nivel celular, pueden ser directos si actúan al entrar en contacto con el DNA o indirectos si dañan moléculas intermediarias que son componentes de la división celular, como lípidos o proteínas las cuales pueden ser dañadas por intermediarios como ROS. Los mecanismos secundarios consisten en la habilidad de las NPs de inducir inflamación crónica, que

resulta en la generación exacerbada y sostenida de ROS por macrófagos y neutrófilos reclutados en el sitio del daño como mecanismo de defensa (Figura 2; Lee *et al*, 2013; Zijno *et al*, 2015).

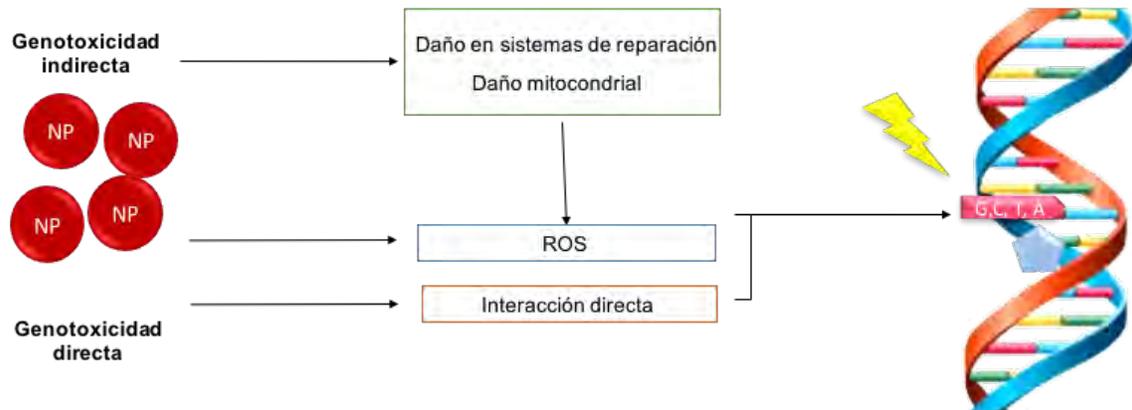


Figura 2. Mecanismos de genotoxicidad directa e indirecta por acción de NPs. Las NPs pueden interactuar con el DNA rompiendo el esqueleto de azúcar-fosfato o mediante especies reactivas de oxígeno (ROS) oxidando cualquiera de las cuatro bases que componen el DNA (C, G, T, A), sin embargo, se sabe que la oxidación de las guaninas (G) es la lesión más común.

Se han hecho diversos estudios con NMs para probar su capacidad de inducir genotoxicidad y en la mayoría se han encontrado resultados positivos. Por ejemplo, en una revisión de Landsiedel en el 2009, de 26 NMs probados, se encontraron 20 que dieron resultado positivo en daño a DNA y sólo 6 dieron resultados negativos (Landsiedel *et al*, 2009). Además, se han realizado otros estudios más recientemente en los que se ha visto el mismo efecto (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto genotóxico de distintos NMs en diversas líneas celulares.

ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD DE NMS				
NANOMATERIAL	Modelo	Concentración genotóxica	Referencia	
BASE DE CARBÓN	Fullerenos C60	Linfocitos humanos	2.2 µg/L	Dhawan <i>et al</i> , 2006.
	Nanotubos de carbón de pared simple	Células V79 de fibroblastos de riñón	96 mg/cm ²	Kisin <i>et al</i> , 2007.
	Nanotubos de carbón de pared múltiple	Células MCF-7 de cáncer de mama y RLE de pulmón de ratón	50 µg/mL	Muller <i>et al</i> , 2008.
	Carbon black	Células A549 de adenocarcinoma de pulmón	100 µg/mL	Mroz <i>et al</i> , 2008.
	Grafeno	Células mesenquimales humanas	0.1 µg/mL	Akhavan <i>et al</i> , 2012.
DENDRÍMEROS	PPI (poli propilen imina)	Células sanguíneas mononucleares	500 µg/mL	Ziembra <i>et al</i> , 2012.
	PAMAM	Células CHO-K1 De ovario de hámster chino	800 µg/mL	Shah <i>et al</i> , 2013.
QUATUM DOTS	CdSe quantum dots con ácido mercaptoacético	<i>In vivo</i> en ratones vía oral	2000 mg/kg	Khalil <i>et al</i> , 2011.
	Dióxido de titanio (TiO ₂)	Linfocitos de sangre periférica de humano	100 µg/mL	Demir <i>et al</i> , 2013.
ÓXIDOS METÁLICOS	Óxido de zinc (ZnO)	Fibroblastos de embrión de ratón	5 µg/mL	Yang <i>et al</i> , 2009.
	Plata (Ag)	BEAS-2B células de cáncer de pulmón	10 µg/mL	Gliga <i>et al</i> , 2014.
	Óxido de cobre (CuO)	Células A549 de adenocarcinoma de pulmón	40 µg/mL	Karlsson <i>et al</i> , 2008.

1.3 Nanopartículas de dióxido de titanio

Las TiO₂ NPs son el NM más producido a nivel mundial (Garduño-Balderas *et al*, 2015). Estas son sintetizadas a partir de dióxido de titanio (TiO₂; CAS-No.13463-67-7), el cual también es conocido como óxido de titanio (IV), ácido de titanio anhidro, titanio, anhídrido titánico o blanco titanio y es la forma natural del titanio (Shi *et al*, 2013). El TiO₂ es un polvo blanco insoluble en agua y que se encuentra de manera natural principalmente en tres formas cristalinas: rutilo, anatasa y brookita (Figura 3: Peters *et al*, 2014). Es un material semiconductor, químicamente inerte y tiene actividad

fotocatalítica (Houas *et al*, 2011; Obolenskaya *et al*, 2015). Estas características le dan un amplio campo de aplicaciones, como en la fabricación de pinturas, papeles, celdas solares, plásticos, excipientes en tabletas. También se utiliza en varios productos de uso personal como cosméticos, protectores solares y como aditivo en alimentos, es muy utilizado principalmente porque en bajas cantidades se pueden obtener las propiedades deseadas (Peters *et al*, 2014).

El TiO_2 ha sido clasificado en el grupo 2B de la IARC como posible carcinógeno para humanos, esto debido a estudios en ratas en los que se ve la formación de tumores en los pulmones tras la exposición prolongada vía inhalatoria a TiO_2 (IARC, 2006). De las estructuras cristalinas del TiO_2 , se sabe que la anatasa es la más químicamente reactiva (Shi *et al*, 2013; Sayes *et al*, 2006), debido a que la actividad fotocatalítica del TiO_2 al ser expuesto a luz UV, incrementa al aumentar la fracción de anatasa en las partículas (Jang *et al*, 2001). Además, debido a que se sabe que la anatasa genera ROS al ser expuesta a luz UV, se ha sugerido que puede tener mayor potencial tóxico que el rutilo y la brookita (Sayes *et al*, 2006).

FORMAS CRISTALINAS DEL DIÓXIDO DE TITANIO

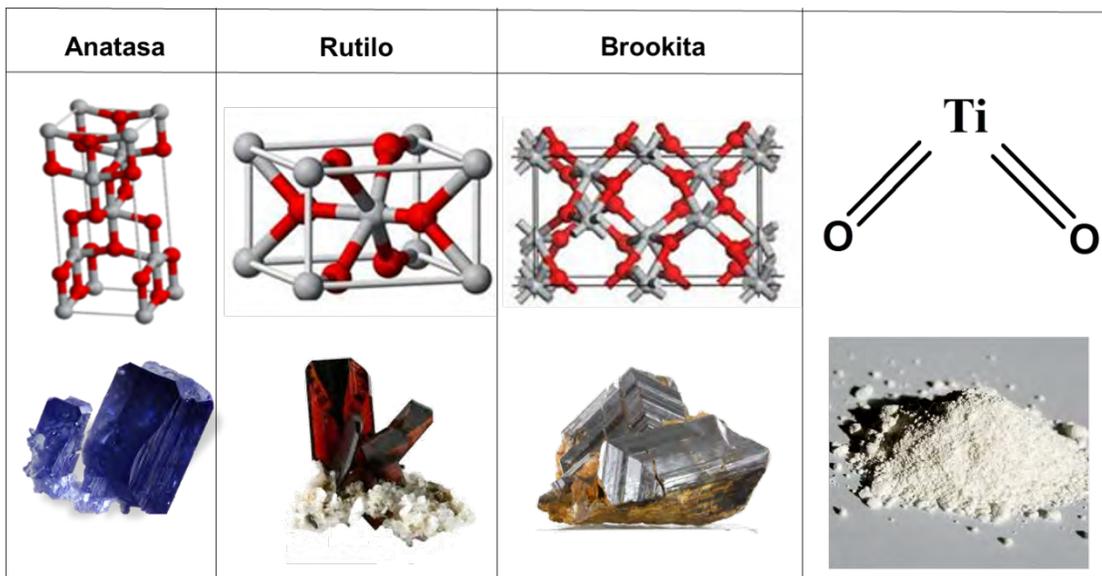


Figura 3. Formas cristalinas del dióxido de titanio (TiO_2) con su respectivo arreglo molecular. A la derecha se muestra la estructura química y la vista del polvo comercial de TiO_2 . Peters *et al*, 2014.

Se sabe que las TiO_2 NPs difieren de su material original en cuanto a los efectos biológicos debido a que sus propiedades fisicoquímicas pueden cambiar con el tamaño, la forma y la composición de la partícula (Shi *et al*, 2013). El área de reacción del TiO_2 aumenta al disminuir su tamaño y así se mejoran sus propiedades físicas, es por esto que la fabricación de TiO_2 NPs ha crecido exponencialmente en los últimos años alcanzando un estimado de 10,000 toneladas al año (Piccinno *et al*, 2012).

1.4 El dióxido de titanio como aditivo en los alimentos (E171)

Se consideran como aditivos para alimentos a las sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación (NOM-187-SSA1/SCFI-2002, 2003).

El TiO_2 utilizado como aditivo en los alimentos recibe el nombre de E171 (Figura 4), según la designación de la Unión Europea. Otros nombres para el E171 son CI77891 y pigmento blanco 6. El E171 está disponible en forma de anatasa, rutilo o una mezcla de los dos, sin embargo se prefiere la utilización de anatasa debido a que brinda mayor blancura (Peters *et al*, 2014).

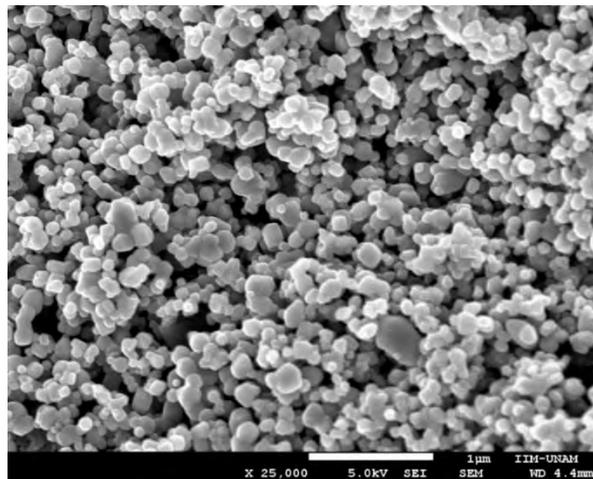


Figura 4. Imagen de E171 obtenida por microscopia electrónica de barrido. Tomado de Urrutia-Ortega *et al*, 2016.

El E171 está aprobado como aditivo en alimentos desde 1966 (FDA, 2015) y se utiliza en diversos alimentos para darles color blanco, brillo u opacidad, además es usado en

productos farmacéuticos como excipiente en tabletas. Se ha encontrado que entre los alimentos con mayor concentración de titanio están las gomas de mascar con cubierta dura, dulces confitados, bebidas preparadas de polvo endulzado y repostería (Figura 5: Weir *et al*, 2012; Athinarayanan *et al*, 2015). Estos alimentos pueden llegar a contener hasta 5 µg Ti/ mg de alimento. Además se estima que en la población de Estados Unidos y el Reino Unido, el intervalo de ingesta de E171 va desde 0.2 hasta 3 mg TiO₂/kg_{bw}/al día (Weir *et al*, 2012). Además, el E171 es utilizado en México en la elaboración de harinas, tortillas y tostadas preenvasadas, helados, quesos frescos y procesados, dulces a base de leche y todo tipo de cremas. Este puede ser utilizado según las buenas prácticas de manufactura las cuales indican que debe utilizarse la mínima cantidad de E171 necesaria para alcanzar las propiedades deseadas (NOM-243-SSA1-2010).

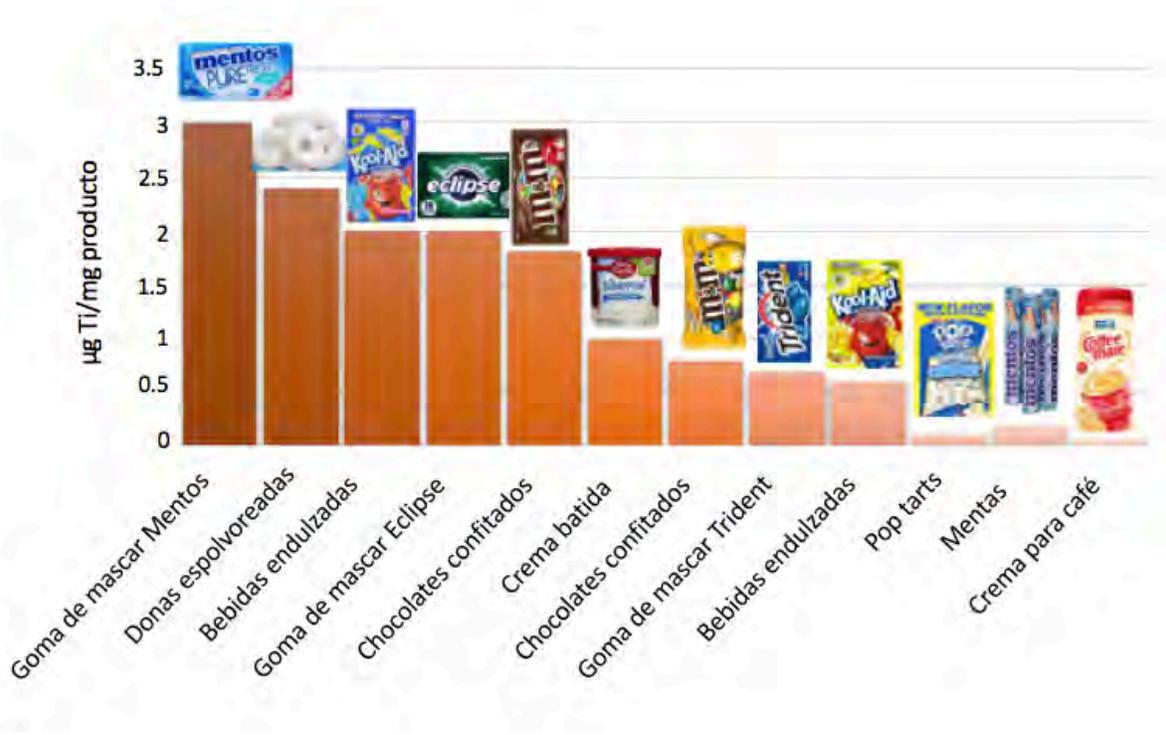


Figura 5. Cantidad de titanio por mg de producto en diversos alimentos. Modificado de Weir *et al*, 2012.

Por otro lado, en Estados Unidos el E171 puede ser utilizado en una concentración de hasta 1% del peso del producto, mientras que en la Unión Europea se puede usar en

niveles *quantum satis* lo que significa “añadir cuanto sea necesario de un ingrediente para que sea alcanzado el efecto deseado, pero no se añada más si se considera demasiado” (Traducido de <http://food.gov.uk/multimedia/pdfs/guidance.pdf> consultado el 08/06/2016).

A pesar de que el E171 es un colorante muy utilizado en alimentos, la información de las propiedades fisicoquímicas de las TiO₂ NPs en alimentos es limitada. Tal información es importante para aportar bases para la estimación del riesgo por exposición oral a TiO₂ NPs en humanos (Yang *et al*, 2014). En años recientes se ha encontrado presencia de hasta 36% TiO₂ NPs en alimentos (Peters *et al*, 2014; Weir *et al*, 2012), lo cual causa preocupación por sus efectos sobre la salud del sistema gastrointestinal en humanos.

1.5 Efecto de las nanopartículas de dióxido de titanio en distintos modelos experimentales del tracto gastrointestinal

Existen diversas vías de exposición por las cuales los humanos podemos estar en contacto con TiO₂ NPs. Las más importantes son la vía inhalatoria en ambientes ocupacionales, la vía dérmica mediante el uso de protectores solares y cosméticos, y la vía oral, mediante el consumo de alimentos con E171. Se ha demostrado que la inhalación crónica de TiO₂ NPs puede causar efectos cancerígenos y también se sabe que la exposición mediante la vía dérmica no representa un riesgo para la salud, sin embargo, la vía oral ha sido muy poco estudiada (Shi *et al*, 2013).

Estudios *in vivo* en humanos

Se han realizado muy pocos estudios sobre los efectos de las TiO₂ NPs en humanos y aún menos con E171. En biopsias de niños de 3 a 18 años con enfermedad inflamatoria del intestino se encontraron cúmulos de pigmentos en las placas de Peyer compuestos principalmente de titanio y aluminosilicatos. Además estos cúmulos de pigmento mostraron un aumento de tamaño con relación a la edad de los niños, lo que puede indicar que hay acumulación de pigmentos a través de los años (Hummel *et al*, 2014). En otro estudio, en el que voluntarios humanos consumieron una capsula con 50 mg de E171, se encontró que después de 6 h de haber sido ingerido se encuentra la mayor absorción en torrente sanguíneo además que la

principal ruta de absorción es el intestino en su parte distal. Esto indica que el E171 puede ser absorbido y distribuido en el sangre después de haber sido consumido vía oral (Pele *et al*, 2015). Por otro lado, Jones *et al*, en el 2015 administraron 5 mg/kg_{bw} de NPs (15 y 100 nm) y micropartículas (<5 µm) de TiO₂ a voluntarios y no encontraron evidencia de absorción del TiO₂ sin importar el tamaño de las partículas (Jones *et al*, 2015).

Estudios *in vivo* en modelos murinos

Se han realizado diversos estudios en sistemas murinos para evaluar los efectos de las TiO₂ NPs en diferentes partes del tracto gastrointestinal. Wang, *et al* en el 2007 administraron 5 g/kg_{bw} de NPs nanométricas (25 y 80 nm) y partículas finas (155 nm) de TiO₂ vía intragástrica en ratones y encontraron acumulación en hígado, bazo, riñones y pulmones lo que indica que el TiO₂ puede llegar a diversos órganos a través del tracto gastrointestinal (Wang *et al*, 2007). Nogueira, *et al* en el 2012 encontraron que las partículas de TiO₂ en tamaño nanométrico (66 nm) y en tamaño micrométrico (260 nm), administradas en dosis de 100 mg/kg_{bw} por medio de una sonda a ratones macho ocasionaban inflamación e hiperplasia en el intestino delgado (Nogueira *et al*, 2012). Brun, *et al* en el 2014 administraron TiO₂ NPs de 12 nm vía intragástrica en ratones y encontraron regiones ricas en Ti en las vellosidades del íleon y en la periferia de los nódulos linfáticos de los ratones, así como que la exposición a las TiO₂ NPs aumentó la permeabilidad paracelular en el intestino y disminuyó la expresión de genes que codifican proteínas que influyen en el mantenimiento de las uniones celulares en el íleon. Esto sugiere que las TiO₂ NPs pueden pasar a través del íleon sugiriendo la ruta paracelular por medio de las conexiones celulares rotas (Brun *et al*, 2014). Por otro lado, se ha visto que el E171 puede llegar a la circulación sanguínea tras 6 h de ingestión (Pele *et al*, 2015). Además, en un modelo murino de cáncer colorrectal se encontró un aumento significativo de tumores en el colon al administrar E171 vía intragástrica y se demostró que el E171 puede ser internalizado en células de colon y almacenado durante varias divisiones celulares (Urrutia-Ortega *et al*, 2016). Cabe señalar que la heterogeneidad en las condiciones de exposición de los diversos estudios lleva a una interpretación parcial de los riesgos de exposición y

deben llevarse a cabo estudios más apegados a la realidad en cuanto a las condiciones de exposición (lavicoli *et al*, 2011).

Estudios *in vitro* relacionados al tracto gastrointestinal

Los modelos *in vitro*, permiten observar de manera más específica diferentes mecanismos de toxicidad. Se han realizado diversos estudios *in vitro* en los que se ha encontrado que la toxicidad de las TiO₂ NPs depende de características como; a) tamaño, la toxicidad aumenta al disminuir el tamaño, b) forma, c) área superficial, entre mayor es el área superficial, mayor es la toxicidad y d) carga de la superficie, esta última afecta en mayor medida a la respuesta inflamatoria celular y la internalización de las NPs, dependiendo de la línea celular utilizada (lavicoli *et al*, 2011).

En diversos estudios en los que se han expuesto líneas celulares relacionadas al tracto gastrointestinal a TiO₂ NPs por 24 h, se ha encontrado formación de especies ROS en células de cáncer colorrectal (Caco-2; De Angelis *et al*, 2013), estrés oxidativo y genotoxicidad en células de cáncer de epitelio gástrico (AGS; Gerloff *et al*, 2009, Botelho *et al*, 2014). Estos estudios utilizaron concentraciones desde 20 hasta 150 µg/mL. Jones *et al* en el 2015 expusieron células Caco-2 a 50 y 100 µg/mL de TiO₂ NPs y a micropartículas de TiO₂ (TiO₂ MPs) por 3 horas, y encontraron que la penetración en la parte basal de la capa celular fue de menos del 0.05% en todas las concentraciones utilizadas. Teubl *et al* en el 2015 utilizaron TiO₂ NPs hidrofílicas de 20 nm recubiertas con glicerol y TiO₂ NPs hidrofóbicas de 20 nm recubiertas con dimeticona que aplicaron a células de epitelio bucal de humano (TR146) y a células de pulmón de hámster chino (V79) en concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/mL por 24 h. Encontraron que las NPs hidrofílicas inducían una mayor producción de ROS. Brun *et al*, en 2014 administraron TiO₂ NPs de 12 nm en concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL a células Caco-2, células Caco-2 en co-cultivo con células de adenocarcinoma de colon HT29-MTX (Caco-2/HT29-MTX) y células Caco-2 en co-cultivo con células de linfoma RajiB (Caco-2/RajiB). Encontraron que los aglomerados de TiO₂ NPs no solo pasan a través del modelo Caco-2/RajiB y que a diferencia de los modelos *in vivo* y *ex vivo*, no hubo disrupción en las uniones celulares, en las células Caco-2 se observó poca acumulación y en el co-cultivo Caco-

2/HT29-MTX las TiO₂ NPs se acumularon principalmente en las células HT29-MTX. Además, en células intestinales se ha visto que las TiO₂ NPs pueden atravesar el epitelio intestinal por transcitosis, causando pocos efectos y conservando la integridad del mismo y en células individuales se han visto daños en la mucosa e impedimento en la absorción de nutrientes. También es importante señalar, que al igual que en los estudios *in vivo*, existe una gran controversia sobre las concentraciones y métodos utilizados, ya que estos pueden influir fuertemente en la interpretación de los resultados. Además, no en todos los estudios se especifican las características de las NPs utilizadas, esto limita también la interpretación y la extrapolación de los resultados de forma que estén más pegados a la realidad (Iavicoli *et al*, 2011, Kroll *et al*, 2012).

1.6 Genotoxicidad por exposición a nanopartículas de dióxido de titanio

A pesar de que el E171 había sido considerado inerte y seguro para su utilización en los alimentos por la FDA desde 1966, se sabe que el porcentaje de TiO₂ NPs en este aditivo ha aumentado y el aumento de la exposición a E171 en la dieta se ha relacionado con el aumento de enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn que a su vez es asociada al cáncer colorrectal (CCR; Lomer *et al*, 2002; Powell *et al*, 2010; Triantafyllidis *et al*, 2009). Además, se ha encontrado genotoxicidad causada por la exposición a TiO₂ NPs en diferentes líneas celulares (Chen *et al*, 2014), por lo que se debe analizar si el E171 es capaz de generar daño al DNA, ya puede causar mutaciones que lleven al desarrollo de cáncer o participar en la exacerbación del mismo.

Las pruebas mayormente utilizadas para evaluar el daño genotóxico inducido por la exposición a NPs son el ensayo cometa y el de micronúcleos (MN) éstos se encuentran dentro de los lineamientos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) para la evaluación de químicos (OECD, 2014). Sin embargo, aún hacen falta pruebas estandarizadas o la adaptación de los ensayos existentes para la evaluación del riesgo por exposición a NPs, ya que en algunos casos se ha visto que pueden interferir con los resultados y la interpretación de los mismos (Gonzalez *et al*, 2010). La técnica de MN determina el daño cromosómico inducido por un agente químico o físico, los MN son cuerpos extranucleares que contienen DNA y se pueden formar

principalmente debido a rupturas de doble cadena en el DNA, o una mala reparación de rupturas de cadena simple, llevando a rupturas de doble cadena y alteraciones en el huso mitótico o en la regulación de la división celular (Kirsch-Volders *et al*, 2011). Por otro lado, la histona H2AX es indispensable en la señalización para la reparación del DNA y es fosforilada en sitios dañados para reclutar otras moléculas reparadoras del DNA, H2AX es fosforilada en la serina 139 por la cinasa ATM y entonces es llamada γ H2AX. La histona γ H2AX es un indicador sensible de rupturas de doble cadena en el DNA incluso 100 veces más sensible que el ensayo cometa (Kuo & Yang, 2008). De un total de 36 estudios *in vitro* de genotoxicidad que se han realizado por exposición a TiO₂ NPs, 29 han resultado positivos y sólo 7 han resultado negativos, esto ha generado controversia ya que en todos estos estudios se han utilizado partículas con diferentes características, diferentes métodos y diferentes líneas celulares, haciendo imposible llegar a una conclusión sobre la genotoxicidad de las TiO₂ NPs (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes estudios sobre la genotoxicidad de las tio₂ nps en diferentes líneas celulares. Se muestran los estudios más representativos y se indica con un símbolo de (+) si los estudios dieron positivos para genotoxicidad y un símbolo de (-) si el resultado fue negativo.

ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD DE TiO ₂ NPS						
ENSAYO	TAMAÑO Y ESTRUCTURA	CONCENTRACIONES (µg/mL)	LÍNEA CELULAR	RESULTADO	REFERENCIA	
COMETA Detecta rupturas de cadena simple y doble	21 nm; 80/20 anatasa/rutilo	150	AGS de epitelio gástrico humano	+	Botelho et al, 2013.	
	2.3 nm	100	HEK293 células de riñón de embrión humano	+	Demir et al, 2013.	
	10 nm; anatasa	0.8-80	A431 células epidermales	+	Shukla et al, 2013.	
	10 nm; anatasa	40	CHO-K1 células de ovario de hámster chino	-	Wang et al, 2011.	
	62 nm; rutilo	50	Células de embrión de hámster sirio.	-	Guichard et al, 2011.	

GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A DIÓXIDO DE TITANIO GRADO ALIMENTICIO (E171) EN CÉLULAS DE CÁNCER COLORRECTAL

MICRONÚCLEOS detecta rupturas de doble cadena, daño cromosómico y se considera biomarcador de riesgo de cáncer	15-30 nm; anatasa	20-200	Linfocitos de sangre periférica de humano	-	Hackernber et al, 2011.
	20 nm	0.5 y 1	Células de ovario de hámster chino	+	Di Virgilio et al, 2010.
	30-70 nm	1-80	HepG2	+	Shukla et al, 2013.
	10 nm: anatasa	0.8-80	A431 Células epidermales humanas	+	Shukla et al, 2011.
	25 nm: anatasa/ rutilo	80% 50 12%	Células de embrión de hámster sirio	-	Guichard et al, 2012
	14 nm: anatasa	50	Células de embrión de hámster sirio	-	Guichard et al, 2012
	62 nm: rutilo	50	Células de embrión de hámster sirio	-	Guichard et al, 2012

1.7 Riesgos del consumo de E171 en el tracto gastrointestinal

Ya que se ha demostrado que las TiO₂ NPs podrían causar inflamación, formación de ROS y daño a DNA, surgen preguntas sobre los efectos adversos que podría tener su consumo en la salud del tracto gastrointestinal. Por otro lado, se sabe que el colon es uno de los órganos en los que hay mayor acumulación de TiO₂, hasta de 4% del total consumido (Jani *et al*, 1994). Debido a esto, y a que se ha demostrado que las TiO₂ podrían estar participando en procesos de genotoxicidad, formación de ROS e inflamación crónica, se ha propuesto que enfermedades como la colitis y el CCR podrían verse exacerbados en colon debido a la ingesta de E171, esto ha sido comprobado en modelos murinos a los cuales se les administro E171 por vía intragástrica (Urrutia-Ortega *et al*, 2016; Ruiz *et al*, 2016).

La colitis es una enfermedad que consiste en la inflamación crónica del colón y que al igual que el CCR está principalmente ocasionada por factores ambientales relacionados a la alimentación, por ejemplo, el alto consumo de carnes rojas y la baja cantidad de fibra en los alimentos (Ruiz *et al*, 2016). El CCR, es el crecimiento descontrolado del epitelio colónico producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión asociadas a alteraciones genéticas heredadas, derivadas de factores ambientales y/o procesos inflamatorios crónicos (Pino & Chung, 2010; West *et al*, 2015). Es el cáncer con el tercer lugar de incidencia a nivel mundial en ambos sexos (IARC, 2012). Alrededor del 55% del CCR ocurre en regiones de países desarrollados como Australia, Europa y Norte América, debido principalmente al estilo de vida sedentario y una dieta con alto contenido calórico y baja en fibra, además de estar relacionado al tabaquismo y al consumo de bebidas alcohólicas (Kim *et al*, 2013; Torre *et al*, 2015). Además, distintos aditivos que son utilizados como colorantes, por ejemplo, la tartrazina (amarillo no. 4, CAS no. 1934-21-0), el rojo allura (rojo no. 40, CAS no. 25956-17-6) y el rojo amaranto (rojo no. 2, CAS no. 915-67-3) pueden causar daño genotóxico en colon y otros como el amarillo mantequilla (*p*-dimetilaminoazobenzeno; CAS no. 60-11-7) han sido prohibidos por ser carcinogénicos en varias especies animales (Sasaki *et al*, 2002).

El CCR puede surgir como consecuencia de eventos de genotoxicidad que induzcan inestabilidad genómica, la cual, está presente en las células cancerígenas desde el inicio y a lo largo del desarrollo del cáncer (Figura 6; Pino & Chung 2010). La inestabilidad genómica es un fenómeno caracterizado como precursor del cáncer y se define como una elevada tendencia del genoma para adquirir mutaciones. Estas pueden ser cambios en la secuencia de nucleótidos, pérdida de bases, deleciones, inserciones, rupturas del DNA y aneuploidías (Lengauer *et al*, 1997). Puede ocurrir cuando existe una elevada exposición a carcinógenos por ejemplo a químicos, radiación o agentes biológicos y NPs (Langie *et al*, 2015). La inestabilidad genómica dividirse en inestabilidad cromosómica (CIN) y la inestabilidad de microsátélites (MIN), la primera presente en alrededor del 85% y la segunda en el 15% de los casos de CCR (Goel *et al*, 2003). La CIN puede resultar en pérdida o ganancia de cromosomas y por lo tanto en aneuploidías, como resultado puede haber la pérdida de genes importantes como *APC*

o *p53* que están caracterizados como componentes principales de las vías moleculares que llevan al CCR (Triantafyllidis *et al*, 2009).

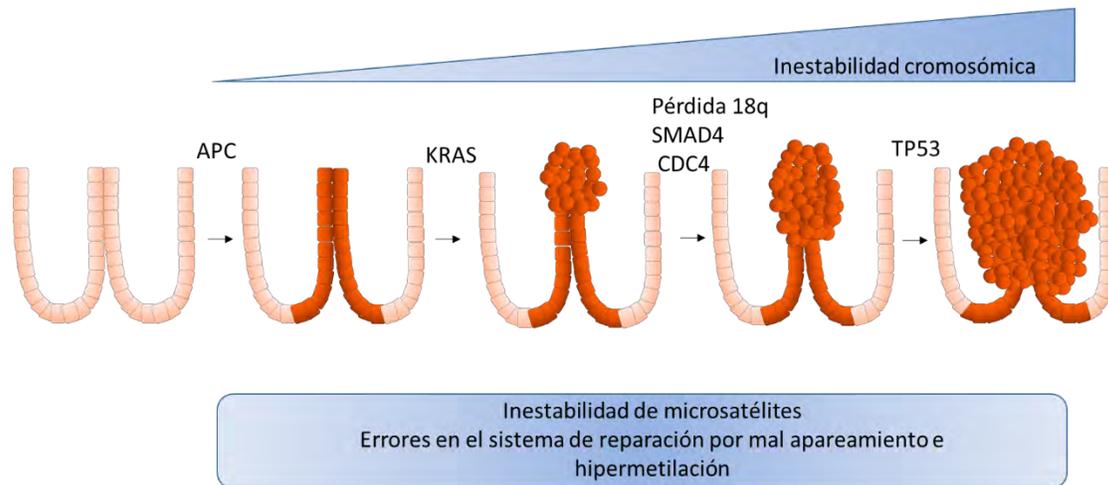


Figura 6. Principales mutaciones en cáncer colorrectal, la inestabilidad cromosómica y de microsatélites conforme avanza la enfermedad. La inestabilidad cromosómica se encuentra desde el inicio, pero aumenta con el desarrollo de la enfermedad mientras la de microsatélites se puede encontrar en la misma medida en cualquier etapa. Se representan las criptas del colon y en rojo se representan las células cancerosas y la progresión del tumor. Modificado de Pino & Chung, 2010.

Debido a lo descrito anteriormente y a la poca información que existe sobre las características y la toxicidad del E171, en este trabajo se administró E171 a un modelo murino de ratones por medio de la dieta y se analizó el daño al DNA en el colon evaluando la histona fosforilada γ H2AX como marcador de rupturas de doble cadena tras 4 y 10 semanas de exposición. Por otro lado, en un modelo *in vitro* de células de cáncer colorrectal (HCT116), se cuantificó el efecto en la viabilidad y la formación de MN como medida de genotoxicidad por la exposición a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de E171 por 24 h. Además para saber el mecanismos de genotoxicidad del E171, se caracterizó su capacidad fotocatalítica en comparación a otras formas de TiO_2 , por medio de la degradación del azul de metileno (AM). Posteriormente, para analizar la interacción directa del E171 con el DNA se realizó un ensayo acelular de degradación del plásmido pmirGLO, el cual se extrajo y se expuso a 0, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de E171 por 24 h, esto con el fin de saber si el E171 puede romper o degradar el DNA ya que podría ser un mecanismo de inducción de genotoxicidad, dado que durante la mitosis la célula no cuenta con envoltura nuclear y es cuando el E171 podría entrar en contacto directo y causar rupturas en el DNA.

2 Justificación

El E171 es el nombre que se le da al TiO_2 grado alimenticio y es un aditivo frecuentemente utilizado en alimentos como colorante blanco. La vía oral es una de las rutas de exposición más importantes mediante la cual la población general está expuesta al E171, sin embargo, es una de las rutas de las que se tiene menor información.

El TiO_2 está clasificado como posible carcinógeno para humanos por vía inhalatoria y existen algunos estudios sobre sus efectos en tracto gastrointestinal que indican que hay acumulación de TiO_2 en colon, translocación a otros órganos, genotoxicidad y en algunos casos que pudieran estar exacerbando procesos carcinogénicos. A pesar de esto, la información que existe sobre el E171 y su genotoxicidad, especialmente en órganos del tracto gastrointestinal como colon, aún es muy limitada e insuficiente para tomar decisiones en cuanto a su regulación y consumo por medio de los alimentos.

Debido a esto y a la continua exposición de la población al E171 por medio de los alimentos, es necesario evaluar los posibles efectos genotóxicos en el colon, así como caracterizar las partículas y los mecanismos por los que pudieran estar ocasionando este daño.

3 Hipótesis

Debido a que, el E171 es acumulado en colon al ser administrado vía intragástrica y produce la exacerbación de procesos carcinogénicos. Los cuales podrían estar asociados a genotoxicidad, la exposición a E171 mediante la dieta en un modelo murino, causará el incremento de rupturas de doble cadena del DNA en colon. Por otro lado, aumentará la formación de micronúcleos en un modelo *in vitro* de células de cáncer colorrectal (HCT116) expuestas a E171 en concentraciones no citotóxicas. Finalmente, debido a que el TiO₂ es fotocatalítico, el E171 presentará capacidad fotocatalítica e inducirá daño directo a DNA plasmídico lo cual puede estar asociado a su genotoxicidad.

4. Objetivo general

Analizar el daño a DNA en colon en un modelo murino expuesto a E171 mediante la dieta durante 4 y 10 semanas. Además, para estudiar el mecanismo de genotoxicidad, cuantificar la formación de MN en células HCT116 expuestas a E171 durante 24 horas, analizar su capacidad fotocatalítica y evaluar el daño directo a DNA plasmídico por exposición a E171.

4.1 Objetivos particulares

- 1) Determinar el daño al DNA en colon de ratones alimentados con E171 en una concentración de 0.5% del peso total del alimento, a las 4 y 10 semanas de exposición.
- 2) Evaluar la citotoxicidad y cuantificar la formación de MN por exposición a 5, 10, 50 y 100 µg/cm² de E171 en células HCT116 tras 24 h de exposición.
- 3) En un sistema acelular, evaluar la capacidad fotocatalítica de las partículas de E171 tras 2 h de exposición a luz UV y analizar la interacción del E171 con DNA plasmídico tras 24 de exposición.

5. Materiales y métodos

5.1 Exposición a E171 en un modelo murino

Se utilizaron 12 ratones BALB/C machos, los cuales fueron alimentados con pellets al 0.5% de E171 por 4 y 10 semanas. El alimento con E171 y el agua potable fue proporcionado *ad libitum*.

5.2 Obtención de colon y procesamiento del tejido

Terminado el tratamiento, los ratones se sacrificaron y se obtuvo el colon distal el cual, tras ser almacenado en paraformaldehído 4% se deshidrató siguiendo los tiempos y las soluciones indicadas en la tabla 3. Posteriormente se embebió en parafina (HYCEL #5674) y se realizaron cortes de 4 µm en porta objetos lisinizados.

Tabla 3. Soluciones y tiempos utilizados para la deshidratación de los tejidos de colon para la realización de cortes histológicos.

Soluciones y tiempos para la deshidratación de tejidos

Solución	Tiempo (min)
<i>Etanol 40%</i>	30
<i>Etanol 50%</i>	30
<i>Etanol 60%</i>	30
<i>Etanol 70%</i>	40
<i>Etanol 80%</i>	40
<i>Etanol 90%</i>	40
<i>Etanol 99%</i>	40
<i>Butanol – etanol (1:1)</i>	30
<i>Butanol</i>	24 horas

5.3 Inmunofluorescencia de γ H2AX

Los cortes del colon se rehidrataron siguiendo las soluciones y tiempos indicados en la tabla 4. Se bloquearon con Albumina (1x) durante 2 h y se lavaron con PBS-Tritón (0.05%) 3 veces, seguido de esto, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario para la histona fosforilada γ H2AX (1:100; AbCam #07-164) la cual es un marcador de rupturas de doble cadena, posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario TritC (1:200; Jackson Research #205-025-108) durante 1 h a 37°C. Las muestras fueron montadas con Entellan y finalmente fueron observadas en un microscopio confocal por microscopía de contraste interdiferencial y por fluorescencia (Leica TCS SP-2, Germany), finalmente, se cuantificó la fluorescencia en 15 campos al azar por triplicado.

Tabla 4. Soluciones y tiempos utilizados para la hidratación de los cortes de colon.

Soluciones y tiempos para la hidratación de tejidos

Solución	Tiempo (min)
<i>Xilol I</i>	3
<i>Xilol II</i>	1
<i>Etanol 99%</i>	1
<i>Etanol 90%</i>	1
<i>Agua destilada</i>	3
<i>PBS</i>	1
<i>PBS-Tritón (0.5%)</i>	5
<i>PBS</i>	1

5.4 Cultivo celular de la línea HCT116 de cáncer colorrectal

La línea celular HCT116 de adenocarcinoma colorrectal fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) (pases 8-12). Las células se mantuvieron en medio McCoy modificado (Num. de catálogo ME-042, In vitro) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Num. de catálogo S1520, Biowest) y 1% de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Estreptomina y Anfotericina; Num. de catálogo A-07, In Vitro) en una incubadora con 37°C y 5% CO₂. Se sembraron 150 000 células en cubre objetos estériles y después de 24 h fueron expuestas a 5, 10, 50 y 100 µg/cm² de E171 durante 24 h.

5.5 Exposición a E171 en el modelo *in vitro*

El E171 fue una donación de Sensient Colors SA de CV con las especificaciones del producto 09970 correspondiente a dióxido de titanio CAS 13463-67-7. Este material fue anteriormente caracterizado y se encontró por medio de una microscopía electrónica de barrido, que es una mezcla de partículas de distintos tamaños arriba y debajo de 100 nm, y con un potencial Z de -30 mV a pH 7 (Urrutia-Ortega *et al*, 2016).

Se sonicaron los tubos del stock (1 mg/ml) por 30 min a 60 Hz para dispersar las partículas de E171 en el medio. Se tomó la cantidad necesaria del stock para exponer el cultivo de células HCT116 a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 µg/cm² (50, 100, 500 y 1000 µg/mL) de E171. Posteriormente se dejaron incubar a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h. Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento sin añadir E171.

5.6 Cuantificación de la viabilidad celular por azul tripano

Se sembraron 150 000 células HCT116 en cajas Petri de 10 cm² y fueron expuestas a 5, 10, 50 y 100 µg/cm² (50, 100, 500 y 1000 µg/mL) de E171 por 24 h. Posteriormente fueron lavadas con Solución salina de Hanks (HBSS) para retirar las partículas y las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1 mL de medio. Por último, se tomaron 10 µL de la solución celular, los cuales fueron resuspendidos en 10 µL de azul tripano (0.4%). Se colocaron 10 µL de la solución de azul tripano y

células (1:1) en una cámara de Neubauer y se contaron las células viables (sin teñirse de azul).

5.7 Cuantificación de micronúcleos como medida del daño cromosómico

Para la cuantificación de micronúcleos se siguió la técnica descrita por Fenech (2000), la cual consiste en bloquear la citocinesis con 4.5 µg/mL de citocalasina B (Num. de catálogo C6762, Sigma) para obtener células binucleadas en las que sea posible cuantificar el número de micronúcleos de una división celular. Después de 24 h de aplicada la citocalasina B las células se fijaron durante 1 hora con paraformaldehído 3% en agitación y se tiñeron los núcleos con Hoescht (Num. de catálogo 62249, Thermo Scientific) dilución 1:300 y se incubó a 37° durante 1 hora, después se montaron en laminillas por grupo. Se cuantificó el número de células binucleadas con MN (CBMN) en 1000 células binucleadas por grupo y por experimento mediante un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Germany). Además, las muestras se observaron por microscopía de contraste interdifereencial (Leica TCS SP-2, Germany) para observar que las partículas se encontraban dentro de las células. Se tomaron fotos de tres experimentos independientes y se presentan las fotos más representativas.

5.8 Cuantificación del potencial fotocatalítico del E171

Para cuantificar el potencial fotocatalítico del E171, se realizó el ensayo de fotocatálisis de AM. Como punto de comparación, se utilizaron también otras dos formas de TiO₂ NPs las cuales han sido reportadas como fotocatalíticas: esferas (TiO₂-S; Num. catálogo 637254, Sigma Aldrich, USA) y cintas (TiO₂-B; sintetizadas por proceso hidrotérmal; Medina-Reyes *et al*, 2015).

Para realizar esta prueba, se pesaron 10 mg de E171 y se suspendieron en 10 mL de una solución de AM al 0.05 mM para obtener una concentración final de 1 mg/mL, la solución se mantuvo en agitación constante durante 2 h con ayuda de un agitador magnético en un vaso de precipitado y se expuso a luz UVC (100-290 nm) de 30 W. Se tomó 1 mL de la solución cada 30 min el cual fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 mL y centrifugado 5 min a 5000 rpm para precipitar las partículas. Los sobrenadantes se

leyeron en un espectrofotómetro (Epoch™ 1209169, BioTek), a una longitud de onda de 664 nm para analizar la concentración de AM restante.

Posteriormente, para analizar si la adsorción de AM en el pellet de E171 interfiere con los resultados del sobrenadante de AM degradado, se realizaron 3 lavados del pellet con HBSS, de los cuales los dos primeros se analizaron en un espectrofotómetro por medio de un espectro UV-VIS de 400 a 700 nm con mediciones cada 50 nm.

Por otro lado, para analizar el potencial fotocatalítico del E171 después de interactuar con material biológico, se incubaron 10 mg de E171 por 24 h con 1 mL de SFB y Albúmina (0.1%) a 37°C y 0.5% de CO₂. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 5 min para recuperar la mayor cantidad posible de partículas y estas fueron resuspendidas en 10 mL de la solución de AM 0.05 mM. Estas soluciones fueron irradiadas de la misma manera que las primeras, con una lámpara de luz UVC durante 2 h, y de igual forma, se tomó 1 mL de la solución cada 30 min el cual fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 mL y centrifugado 5 min a 5000 rpm para precipitar las partículas, finalmente los sobrenadantes se leyeron en el espectrofotómetro a 664 nm.

Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento, pero con 10 mL de solución de AM sin agregar ningunas de las partículas. Por otro lado, se colocaron 10 mg de E171 en 10 mL de AM y se dejaron 12 h en oscuridad, tras este tiempo la absorbancia del sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro de igual forma que los anteriores tratamientos.

5.9 Ensayo de degradación de DNA plasmídico

Para analizar si el E171 podría tener interacción directa con el DNA, se realizó un ensayo de degradación de DNA plasmídico en el cual se buscó ver el cambio de forma en el DNA plasmídico como reflejo del daño al DNA por la exposición a E171. Se obtuvieron bacterias *Escherichia coli* capacitadas y se mantuvieron en hielo, posteriormente se les transfirió 10 µL del plásmido pmiRGLO (Promega) en un baño de 37°C, se mezclaron suavemente y se incubaron por 15 min a 4°C, se pasaron a 42°C por exactamente 60 segundos sin agitar y se transfirieron rápidamente a un baño con hielo por 1-2 min para

provocar un choque térmico. Se agregaron 200 μL de medio McCoy y se incubaron a 37°C por 45 min. Se tomaron 100 μL y se colocaron en placas de agar de 10 cm^2 las cuales se incubaron a 37°C por 12-16 horas. Finalmente, se tomaron 6 colonias de la placa y se transfirieron a 6 tubos Falcon de 50 mL con medio (Medio LB broth con 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ampicilina), se incubaron a 37°C toda la noche.

La extracción del plásmido se realizó por medio de la técnica de miniprep, con ayuda del kit GenJET (GenJET #K0502). Se centrifugó el cultivo bacteriano a 4000 rpm por 15 minutos y se resuspendió la pastilla en 250 μL de solución de resuspensión, se mezcló con ayuda de un vortex, se lisaron las bacterias con 250 μL de solución de lisis y se neutralizó la reacción con 350 μL de solución de neutralización, se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm, para precipitar restos celulares y DNA cromosómico. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a una columna la cual se centrifugó por 1 minuto a 12000 rpm. Se lavó la columna con 500 μL de solución de lavado y se centrifugó por 30-60 segundos. Este líquido fue descartado, se centrifugó la columna vacía por 1 minuto. Para eluir el DNA de la columna, se transfirió la columna a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 50 μL de buffer de elución a la columna lo cual se incubó por 2 minutos, por último, se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm y se recuperó el DNA plasmídico el cual fue cuantificado en un espectrofotómetro (Epoch™ 1209169, BioTek) a 260/280 nm. Las alícuotas de DNA fueron almacenadas a -20°C.

El stock de E171 (1 mg/mL) se resuspendió en 1 mL de agua inyectable y se sonicó a 60 Hz por 30 min del cual fueron tomados los volúmenes necesarios para alcanzar las concentraciones deseadas en un volumen final de 20 μL . El DNA plasmídico anteriormente extraído, se expuso a 0, 0.0001, 0.01, 1000 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de E171 en agua inyectable.

Por otro lado, como control positivo se colocó H_2O_2 50 μM (Sigma #H1009) por 24 h. Además, el plásmido se digirió por 8 h con la enzima XbaI (New England Biolabs #R0145S) la cual corta en el sitio T/CTAGA y tiene un solo sitio de restricción en la secuencia del plásmido, esto con el fin de linealizarlo para compararlo con los tratamientos. Los tratamientos fueron incubados por 24 h, posteriormente se tomaron 5

µL del tratamiento a los cuales se añadió 1 µL de buffer de carga (6x) inmediatamente antes de cargar en el pozo para la electroforesis.

Para realizar la electroforesis del DNA plasmídico, se preparó un gel de agarosa (Labcitec #01.01.03B) al 0.8% con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se añadió un marcador de peso molecular (DNA ladder Thermo Scientific #SM1332) en la primera línea del gel, se añadió 1 µL de buffer de carga (Promega #G190A) a las muestras inmediatamente antes de cargar en el pozo para la electroforesis. Se añadieron las muestras a los carriles del gel (300 ng de muestra por carril, volumen final de 6 µL. Se corrió el gel a 70 V por 90 min y se observó en el fotodocumentador (Gel Doc EZ Imager, Bio Rad). Finalmente, se realizó la densitometría de las bandas de DNA para calcular el contenido de DNA (ng) en cada banda, esto se realizó con el programa Image Lab 5.0 (BioRad).

5.10 Análisis estadístico

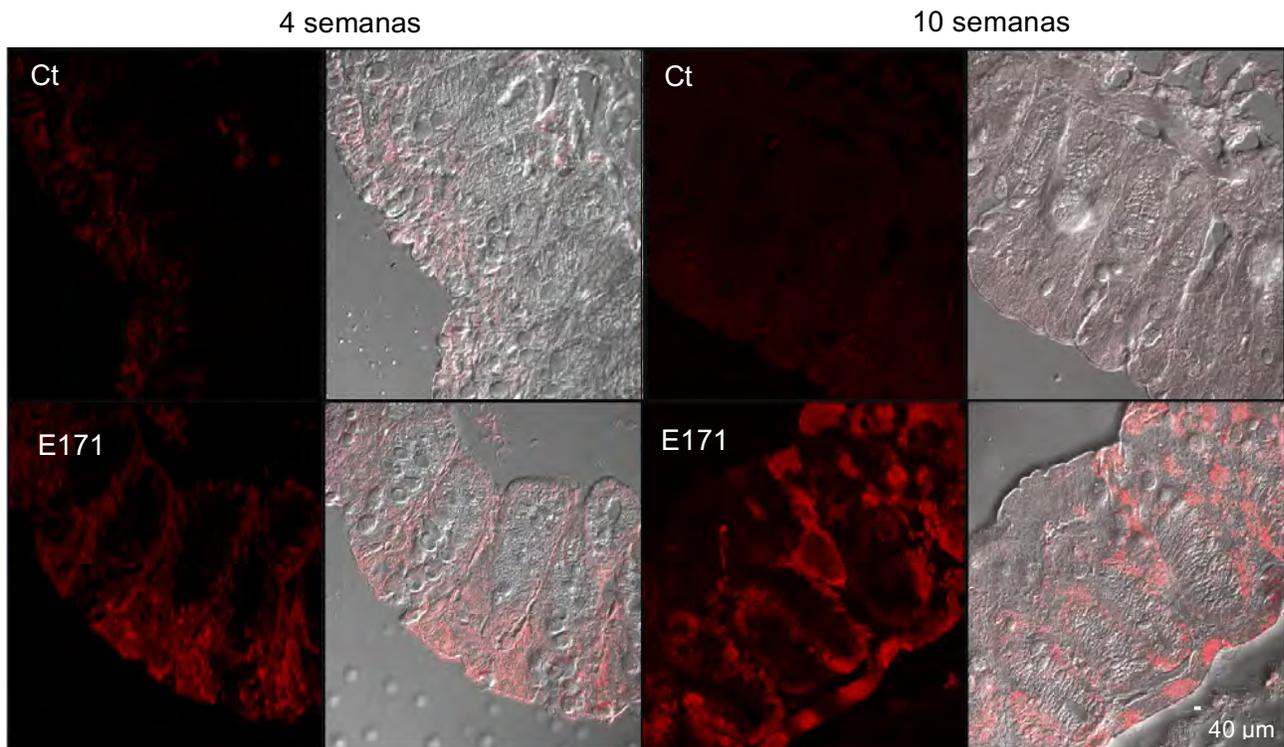
Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados son expresados como media ± error estándar (EE). Los grupos fueron comparados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnet en el caso de la cuantificación de MN para ver diferencias entre medias en comparación al control. Diferencias de * $p < 0.05$ fueron consideradas significativas. Los resultados fueron graficados en el programa GraphPad Prism 5, 2007.

6. Resultados

6.1 Detección de daño a DNA por inmunofluorescencia de γ H2AX en colon de ratones alimentados con E171

Para analizar las rupturas de doble cadena en el DNA del colon de los ratones alimentados con E171, se cuantificó la expresión de la histona γ H2AX en cortes de colon distal tras 4 y 10 semanas de tratamiento. A las 4 semanas de tratamiento, se encontró un aumento significativo de la fluorescencia de la histona fosforilada γ H2AX en los tejidos. El incremento fue de 3 veces en comparación al control y a las 10 semanas, se mantuvo en la misma proporción (Figura 7).

A) Daño al DNA en tejido de colon de ratones alimentados con E171



B) Intensidad de fluorescencia de γ H2AX

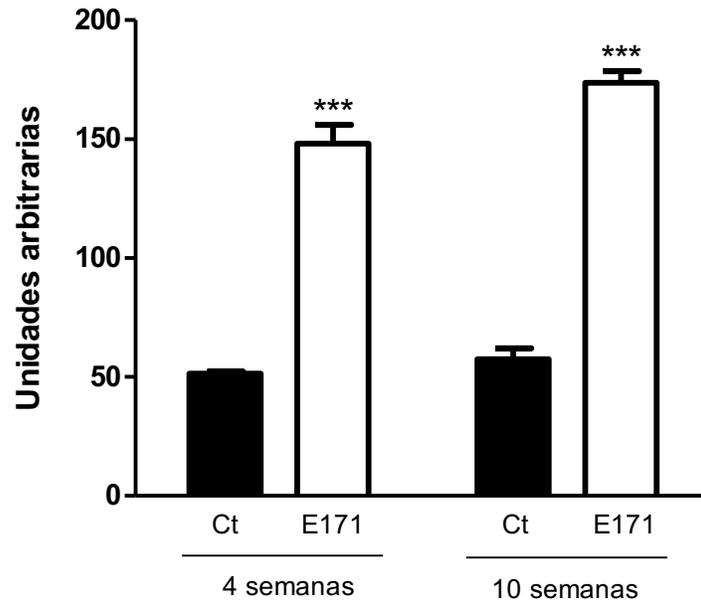


Figura 7. A) Imágenes de inmunofluorescencia de γ H2AX en colon de ratones control y alimentados con 0.5% de E171 por 4 y 10 semanas. B) Cuantificación de la fluorescencia de γ H2AX. Se muestran los promedios \pm error estándar. *** $p \leq 0.001$ vs su respectivo control. $n=3$.

6.2 Cuantificación de la viabilidad celular por azul tripano

Se realizó el ensayo de viabilidad por medio de azul tripano de las células HCT116 expuestas a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 h. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 8) por lo que se decidió utilizar estas concentraciones para el ensayo de MN.

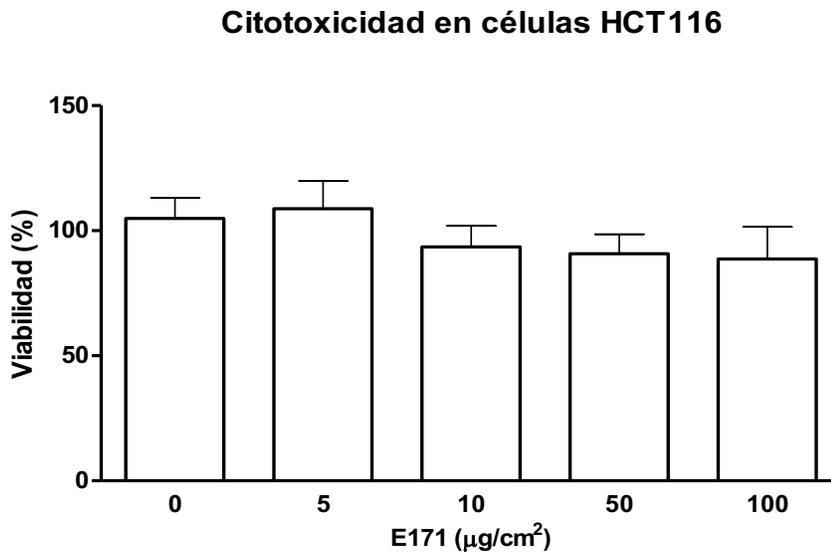


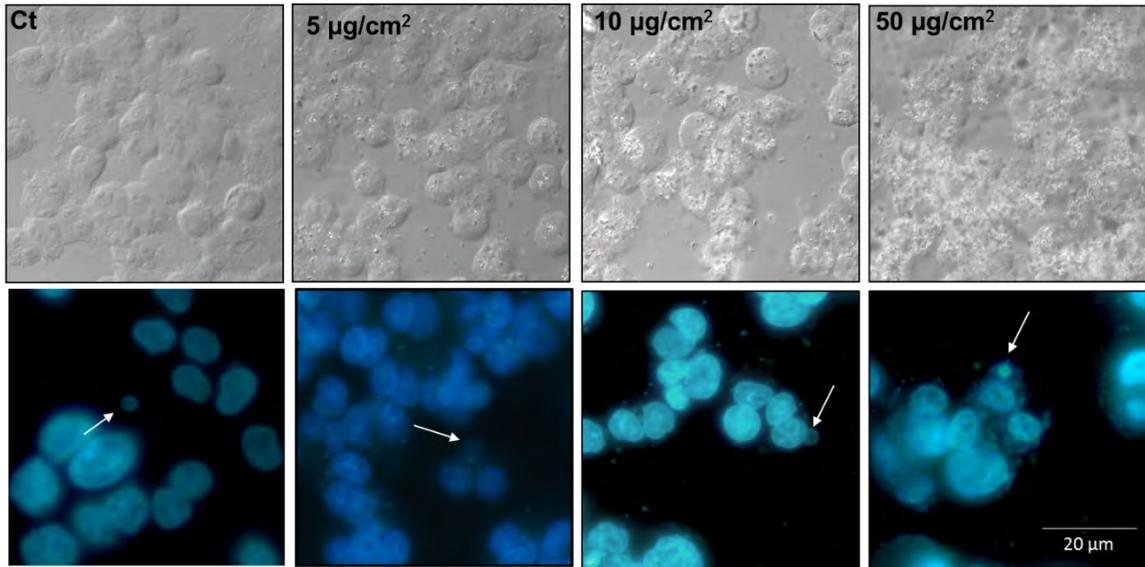
Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular tras la exposición a 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 horas. Se muestra el porcentaje promedio de células con MN \pm error estándar, $n=3$.

6.3 Cuantificación de células binucleadas con micronúcleos

Con el fin de determinar la genotoxicidad por exposición a E171, las células fueron expuestas a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 h y se cuantificó el número de células CBMNs en 1000 células binucleadas. El número de CBMNs aumentó 1.9, 2.4 y 3.6 veces con las concentraciones de 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Figura 9). Los MN en células expuestas a 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no pudieron ser cuantificados debido a la

interferencia de los aglomerados de E171 en el campo de visión del microscopio de fluorescencia.

A) Formación de MN en células HCT116 expuestas a E171



B) Cuantificación de MNBNCs en células HCT116 expuestas a E171

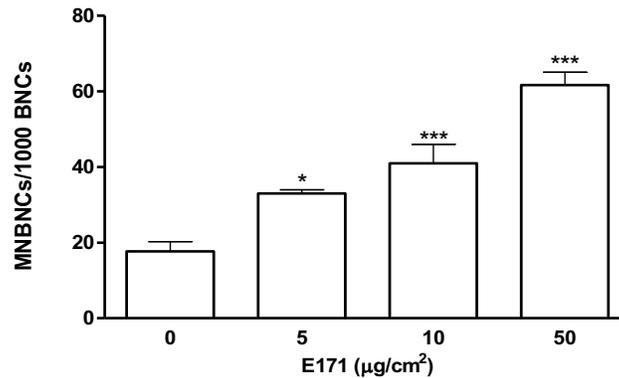


Figura 9. Evaluación del daño genotóxico en células HCT116 por exposición a E171. A) Imágenes representativas de micronúcleos (MN) inducidos en células HCT116 a E171. En la parte superior se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de contraste interdifereencial y las imágenes inferiores fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia. Las flechas señalan los MN adyacentes al núcleo celular. B) Cantidad de células binucleadas con micronúcleos (MNBNCs) en 1000 células binucleadas (BNCs) tratadas con 5, 10 y 50 µg/cm² de E171 por 24 horas. Se muestra el porcentaje promedio de células con MN ± error estándar. n=4. *p<0.05 vs control; ***p<0.01 vs control.

6.4 Potencial fotocatalítico del E171

Para analizar el potencial fotocatalítico del E171 se realizó el ensayo de fotocatálisis de AM en el cual se midió la concentración de AM en el sobrenadante de una solución de E171 y AM expuesta a luz UVC, esto se comparó con otras dos formas de TiO_2 utilizadas en la industria por sus capacidades fotocatalíticas ($\text{TiO}_2\text{-B}$ y $\text{TiO}_2\text{-S}$).

Tras 2 h de exposición a luz UVC el E171 mostró actividad fotocatalítica disminuyendo en un 55% la concentración de AM inicial, por otro lado, las $\text{TiO}_2\text{-B}$ y las $\text{TiO}_2\text{-S}$ disminuyeron 74 y 68% la concentración de AM inicial, respectivamente. Los controles de AM con E171 en oscuridad durante 24 h y AM expuesto a luz UVC durante 2 h no mostraron diferencias en las absorbancias de los sobrenadantes.

Los deltas de absorbancia del sobrenadante del E171, $\text{TiO}_2\text{-B}$ y $\text{TiO}_2\text{-S}$ fueron calculados tras 2 h de exposición en comparación del tiempo 0. Con base en los deltas de absorbancia, la forma de TiO_2 con mayor actividad fotocatalítica fueron las $\text{TiO}_2\text{-B}$, seguidas del E171 y por último las $\text{TiO}_2\text{-S}$ (Figura 10).

A) Degradación de azul de metileno por E171

AM AM+E171 Sobrenadante Pellet



B) Cuantificación de la fotocatalisis por E171

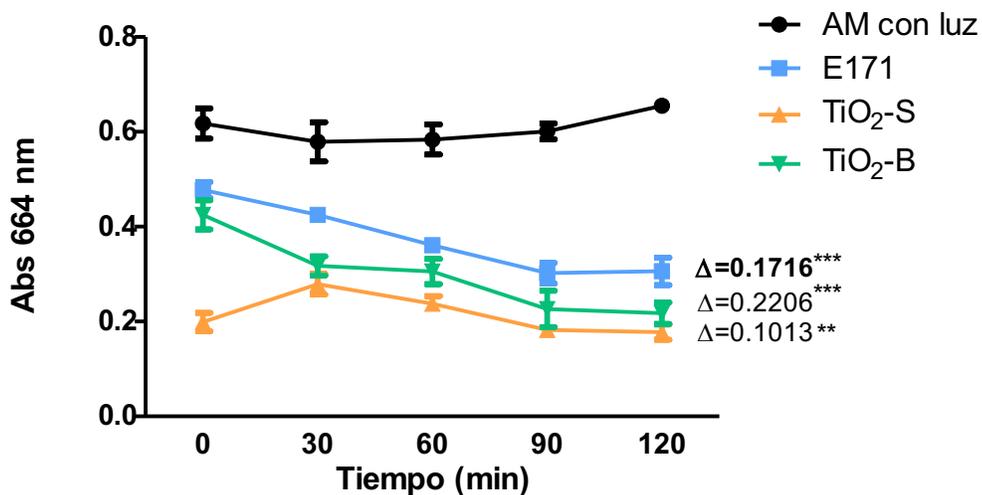


Figura 10. Degradación del azul de metileno (AM) por diferentes formas de TiO₂. Se comparó el E171 con las esferas de TiO₂ (TiO₂) y cintas de TiO₂ (TiO₂-B). A) Imágenes de AM, AM con E171 (1 mg/mL; AM+E171), el sobrenadante de AM y E171 después de 2 h de exposición a luz UV y el pellet del mismo. B) AM restante en el sobrenadante. Se muestra el promedio de absorción ± error estándar n=3. **p ≤ 0.01 vs AM; ***p ≤ 0.001 vs AM.

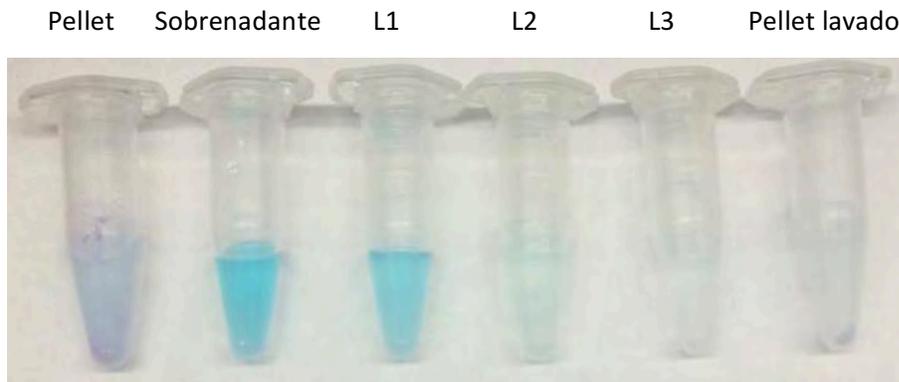
6.5 Adsorción del azul de metileno por E171

Para analizar la cantidad de AM adsorbido en el pellet de E171 tras el proceso de fotocatalisis, este fue lavado 3 veces con HBSS hasta que el pellet quedó blanco (Figura 11). Los primeros dos lavados se midieron en un espectro UV-VIS y se compararon con

la solución de AM y con el sobrenadante de la solución AM y E171 tras 2 h de exposición a luz UVC.

Se encontró el mismo pico en 650 nm de los lavados y el AM, sin embargo, la cantidad de AM liberada por el pellet en el lavado 1 y 2 fue mínima representando el 30 y 20% respectivamente en comparación al sobrenadante de la solución AM y E171 tras 2 h de exposición a luz UVC.

A) Lavados del azul de metileno adsorbido en el E171



B) Medición en espectro UV-VIS del azul de metileno adsorbido en el E171

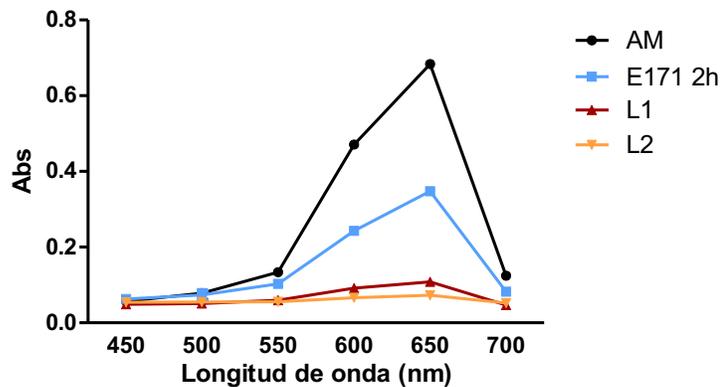


Figura 11. Adsorción de azul de metileno (AM) por las partículas de E171. A) Imágenes de los 3 lavados del pellet (L1, L2 y L3) y el sobrenadante de E171 tras 2 h de exposición a luz UVC en una solución de AM. B) Medición en espectro UV-VIS de 450 a 700 nm cada 50 nm. Se muestran los promedios de absorción en cada longitud de onda \pm error estándar $n=3$.

6.6 Fotocatálisis de azul de metileno por E171 incubado con suero fetal bovino y albúmina

Para analizar la influencia del material biológico del medio en la capacidad fotocatalítica del E171, este fue incubado con SFB y albúmina durante 24 h antes del ensayo de degradación de AM. La incubación del E171 con SFB y albúmina produjo una disminución en el potencial fotocatalítico de las partículas de hasta 5.6 y 2.4 veces respectivamente (Figura 12).

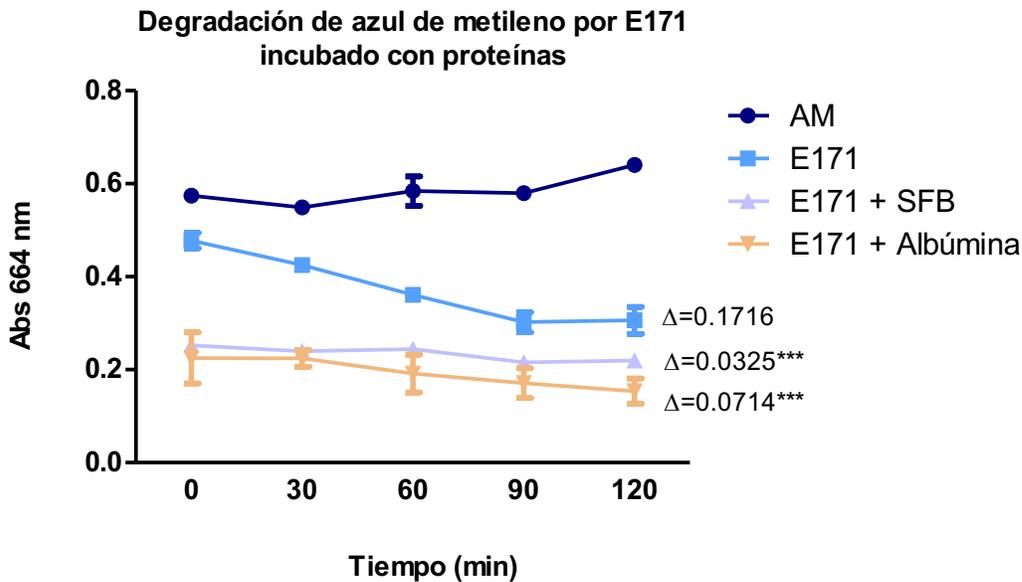


Figura 12. Degradación del azul de metileno (AM) por E171 después de ser incubado por 24 h con SFB y Albúmina 0.1%. Se muestra el promedio de absorción \pm error estándar $n=3$. ** $p<0.05$ vs AM; *** $p<0.01$ vs AM.

6.7 Daño a DNA plasmídico por exposición a E171

Para analizar la interacción directa del E171 con el DNA, se realizó el ensayo de degradación de DNA plasmídico en el que se buscó cuantificar el DNA que cambió de forma súper enrollada (SE) a circular (C) o lineal (L) lo que indica rupturas de cadena sencilla en el DNA en el caso de la forma C y rupturas de doble cadena en el caso de la forma L.

Tras realizar la electroforesis en los geles de agarosa, se observó la acumulación del E171 en los pozos correspondientes a las concentraciones de 1000 y 100 $\mu\text{g/mL}$, los cuales se ven de color oscuro, esto indica que estas partículas no migran en el gel y se quedan acumuladas en el pozo.

Por otro lado, se encontró un aumento en la banda correspondiente a la forma C y una disminución de la banda correspondiente a la forma SE al incrementar las concentraciones de E171, la banda correspondiente a la forma L también aumenta con la concentración de E171, aunque esta aparece muy tenue (Figura 13). Al realizar la densitometría de las bandas para calcular la cantidad de DNA en ng correspondiente a cada forma (SE, C y L) se encontró que la cantidad de DNA en la forma SE disminuyó 1.2 veces en la concentración más alta (1000 $\mu\text{g/mL}$) en comparación a la concentración más baja (0.0001 $\mu\text{g/mL}$) y la cantidad de DNA C aumentó gradualmente a partir de la concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 1.8 veces con la concentración más alta (1000 $\mu\text{g/mL}$) en comparación del control negativo (0 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, la cantidad de DNA L aumentó 0.85, 1, 3 y 2.7 veces con las concentraciones de 0.0001, 0.01, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, en comparación al control negativo (Figura 14).

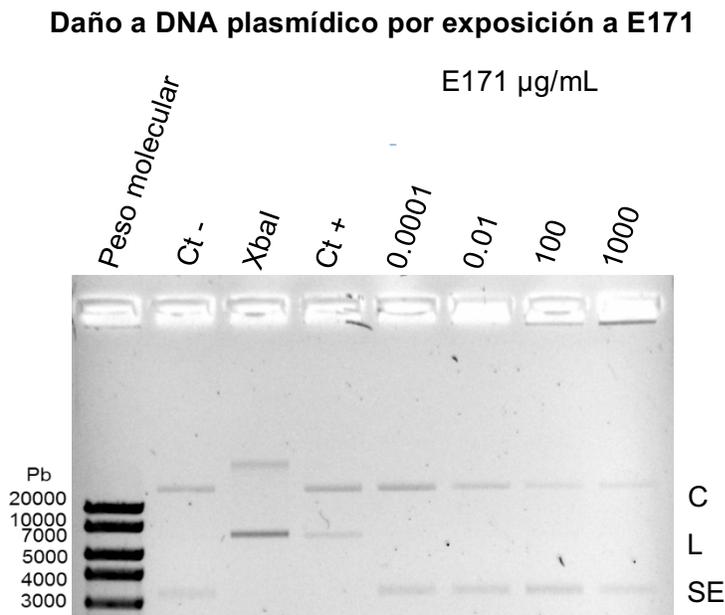


Figura 13. Cambio de forma del DNA plasmídico tras la exposición a 0, 0.0001, 0.01, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de E171. La banda superior corresponde al DNA circular (C), la siguiente al DNA lineal (L) y la inferior al DNA superenrollado (SE). Pares de bases (Pb).

Cuantificación del daño a DNA plasmídico por exposición a E171

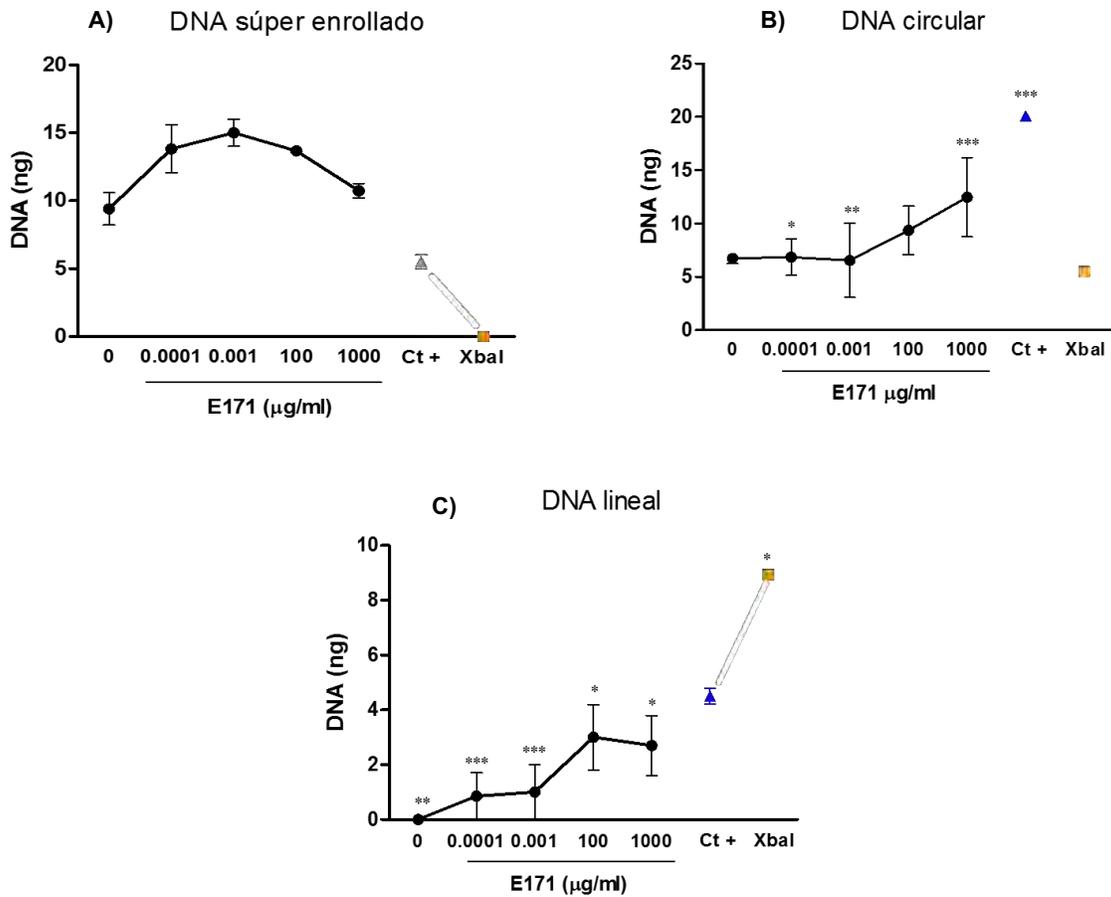


Figura 14. Cuantificación por densitometría de la cantidad de DNA (ng) en cada banda formada por el DNA plasmídico tras la exposición a 0, 0.0001, 0.01, 100 y 1000 µg/mL de E171. Cada gráfica corresponde a distintas formas del plásmido a) superenrollado, b) circular y c) lineal. n=3. *p ≤ 0.05 vs SE; **p ≤ 0.01 vs SE; ***p ≤ 0.001 vs SE.

7. Discusión

El E171 es un aditivo ampliamente utilizado en alimentos y del cual se ha calculado que la población menor a 10 años podría estar consumiendo hasta 3 mg $\text{TiO}_2/\text{kg}_{\text{bw}}/\text{día}$. Los efectos de la exposición vía oral a E171 en sistema gastrointestinal no han sido ampliamente investigados, sin embargo, se ha demostrado que puede ser internalizado por células de colon y almacenado durante varias divisiones celulares, además de que se asocia a un aumento significativo de tumores en un modelo murino de carcinogénesis colorrectal asociado a colitis (Urrutia-Ortega *et al*, 2016). Por otro lado, la información en cuanto a los efectos tóxicos del E171 en el tracto gastrointestinal es muy limitada y hacen falta estudios que utilicen este aditivo en su forma comercial y que investiguen sus efectos en el tracto gastrointestinal. En particular es importante investigar el daño en el DNA, ya que puede favorecer la formación de tumores por la inducción de mutaciones o deleciones además que aumenta la inestabilidad genómica lo que se sabe que está fuertemente relacionado a la aparición y el desarrollo del CCR (Grady, 2004). Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue analizar si la exposición a E171 podría causar daño al DNA en el tracto gastrointestinal, ya que este daño se asocia al inicio y el desarrollo del CCR.

Debido a que en trabajos anteriores se ha visto acumulación y efectos del E171 en colon, en este trabajo se investigó el posible efecto genotóxico del E171 en colon de un modelo *in vivo*. Los ratones fueron expuestos a E171 por medio de la dieta, el E171 se administró en una concentración de 0.5% del peso total del alimento, esta concentración es menor al máximo permitido por la “*Food and Drug Administration*” (FDA), ya que esta permite utilizar hasta el 1% de E171 con respecto al peso de total del alimento sólido. Por otro lado, los ratones consumieron alrededor de 700 $\text{mg}/\text{kg}_{\text{bw}}$ de E171 al día, cada ratón consumió 14 mg de E171 y en promedio el peso de los ratones es de 20 g. Esto comparado con el consumo promedio de un adulto en Estados Unidos y Reino Unido (Weir *et al*, 2012) es hasta 300 veces mayor, sin embargo, en este estudio es representativo para analizar los efectos del consumo de E171 en colon. Al analizar la fluorescencia en los cortes del colon se observó un aumento de hasta 3 veces de daño

al DNA a las 4 semanas de exposición comparado con el control y este daño se mantuvo a las 10 semanas de exposición.

Con estos resultados podemos afirmar que, al administrar E171 a ratones por medio de la dieta se generan focos de rupturas de doble cadena en el DNA, lo cual no había sido demostrado antes, ya que todos los estudios previos habían sido realizados mediante instilación intragástrica. Por otro lado, no se sabe si este daño es por la formación de ROS causada por el E171 en el colon, porque durante la mitosis el E171 pueda entrar en contacto con el DNA al no existir envoltura nuclear o por fallas en los sistemas de reparación o una inactivación de los mismos (Jugan *et al*, 2012). La histona fosforilada γ H2AX se encarga de amplificar la señal de daño en el DNA y de reclutar moléculas como RNF8 (ubiquitin ligasa) y complejos como RAP80-Abraxas y BRCA1-BRCC36, los cuales están asociados a los sistemas de reparación de ruptura de doble cadena además de 53BP1 (proteína ligadora 1 de p53) y MDC1 (mediador del punto de control de daño a DNA (Kuo & Yang, 2008). Existen dos principales mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena, estos son: recombinación no homóloga (NHEJ) y recombinación homóloga (HR). En el primero, la DNA ligasa IV, une las dos hebras rotas de DNA y se basa en secuencias homólogas pequeñas llamadas microhomologías, este sistema de reparación puede producir mutaciones en el DNA como deleciones del material dañado o inserciones y translocaciones al unir las dos cadenas de DNA roto, además, puede activarse en cualquier fase del ciclo celular. Por otro lado, para que se lleve a cabo la HR es necesario que exista un molde idéntico o casi idéntico al de la hebra dañada para que pueda ser reparado el daño. El DNA es reparado mediante la maquinaria presente en las fases S y G2 del ciclo celular utilizando una cromátida hermana como molde por lo que este sistema de reparación sólo está activo en estas fases (Davis *et al*, 2013). En estudios futuros, es importante evaluar estos dos sistemas de reparación para saber si se ven afectados por la exposición a E171 y si esto podría estar influyendo en la genotoxicidad observada.

Para analizar y cuantificar de manera más específica el daño al DNA observado en el modelo *in vivo*, se realizaron análisis de citotoxicidad y genotoxicidad en un modelo *in vitro* con una línea celular de CCR (HCT116). Esta línea se escogió por ser

genómicamente estable para reducir la influencia de la inestabilidad genómica inherente a las células. A pesar de que la línea celular de CCR, Caco-2 es la más utilizada para estudios *in vitro* del tracto gastrointestinal, la línea celular HCT116 es una línea con mayor estabilidad genómica al tener un número modal de 45 cromosomas en un 62% en comparación de la línea celular Caco-2 con un número modal de 96 cromosomas en sólo 16%. Además la frecuencia basal de MN en la línea celular HCT116 es de alrededor de 1.5% mientras que en la línea Caco-2 es de 2.4% (Çavaş *et al*, 2012; Camps *et al*, 2005; ATCC: www.atcc.org consultado el 08/06/2016).

Para el análisis de genotoxicidad *in vitro* se utilizó el ensayo de MN para cuantificar de manera más exacta y específica el daño al DNA por exposición al E171, ya que el ensayo de MN permite observar ruptura de cromosomas o cromosomas rezagados durante la división celular (Fenech, 2007). Para esto fue necesario saber si las concentraciones escogidas eran capaces de inducir citotoxicidad en la célula y afectar la interpretación de los resultados de la prueba de MN. Para medir la citotoxicidad del E171 en las células HCT116 se utilizó el ensayo de azul tripano, el cual es un colorante que sólo traspasa la membrana celular cuando las células están muertas y las tiñe de un color azul oscuro, las células vivas se observan sin teñir. Se escogió este ensayo debido a que se ha sugerido en diversos trabajos que ciertas NPs como las TiO₂ y nanopartículas de “carbón negro” pueden interferir con el ensayo de reducción de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil- tetrazolium-bromide; Kroll *et al*, 2012), ya que pueden reducir el MTT de manera acelular y así interferir con la interpretación de los resultados al no haber diferencias significativas con respecto al control (Lupu *et al*, 2013). Los resultados del ensayo de viabilidad no mostraron diferencias significativas por lo que se decidió utilizar estas concentraciones para el ensayo de MN.

En cuanto al ensayo de MN, pequeñas variaciones metodológicas pueden afectar dramáticamente el resultado de la prueba, por lo que tras una revisión de los ensayos de MN realizados con NPs (Gonzalez *et al*, 2010) además de otras publicaciones (Doak *et al*, 2012) se llegó a la conclusión de realizar el ensayo con 24 h o más de exposición, medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino y la aplicación de citocalasina B después del tiempo de tratamiento para evitar la interferencia de la

citocalasina B con la internalización de las NPs en las células (Landsiedel *et al*, 2009; Magdolenova *et al*, 2012). Los resultados positivos de esta prueba de genotoxicidad por exposición a E171 concuerdan con lo visto en otros estudios en cuanto a la toxicidad de las TiO₂ NPs en los que se investigó la genotoxicidad en diversas líneas celulares mediante el ensayo de MN y el ensayo cometa principalmente. Sin embargo, aún no se comprenden los mecanismos de genotoxicidad por E171 (Chen *et al*, 2014; Wang *et al*, 2007). La formación de MN debido a la exposición a E171 podría estar relacionada con rupturas de doble cadena del DNA, ruptura de cromosomas o impedimento de una correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis (Khalil *et al*, 2011). Además, la línea celular HCT116 tiene una mutación en el gen hMLH1 lo que la lleva a tener deficiencia en el sistema de reparación de mal apareamiento de bases (Mismatch Repair; MMR), esta mutación es característica del síndrome de Lynch, el cual se sabe que eleva el riesgo de CCR y esta mutación podría estar contribuyendo en el número basal de MN que se observa en el control negativo. Sin embargo, su impacto en la formación de MN no es tan grande como el que se podría ver al estar mutado otro sistema de reparación como el de NHEJ o el de HR, además de que el aumento de MN observado con los tratamientos fue concentración dependiente, por lo que se puede concluir que la exposición a E171 induce la formación de MN en células HCT116.

En cuanto a las concentraciones utilizadas en este ensayo, se realizó un cálculo para hacer una comparación aproximada con la exposición de células del colon a E171 en humanos. Se sabe que el consumo diario de E171 para las personas mayores de 10 años, es de 0.2 a 0.7 mg/kg_{bw} (Weir *et al*, 2012), por lo que un adulto de 75 kg consumiría alrededor de 52.5 mg de E171 al día y dado que el área promedio del colon es de 995 cm² (el largo del colon humano es 160.5 cm y la circunferencia promedio es de 6.2 cm; Hounnou *et al*, 2002, Nguyen *et al*, 2010), la exposición del colon a E171 en adultos sería de 52 µg/cm², tomando en cuenta un estudio previo en el que se observó absorción de 4% en colon (Jani *et al*, 1994) podemos calcular que el colon de un adulto podría absorber hasta 2 µg/cm² de E171 al día. Esta cantidad es muy cercana a las concentraciones utilizadas en el ensayo de MN (5, 10 y 50 µg/cm²) por lo que consideramos que estas concentraciones son adecuadas para analizar el efecto del E171 en colon debido a la exposición oral por medio de los alimentos.

Para analizar los mecanismos asociados a la genotoxicidad del E171, se estudió de manera acelular, la capacidad fotocatalítica del E171 y posteriormente sus efectos directos sobre DNA plasmídico. La capacidad fotocatalítica de una NP puede ser tomada como un criterio para considerar su toxicidad, ya que el grado toxicidad de una partícula está directamente relacionada con características de la NP que también la hacen más fotocatalítica (Sayes *et al*, 2006). La capacidad de las NPs de fotocatalizar el medio en el que se encuentran dispersas, varía por diversas características, las más importantes en las TiO₂ NPs son el tamaño de la partícula y su estructura cristalina; entre más pequeñas son las partículas, aumenta su superficie de reacción y por lo tanto el área en el que puede haber reacciones de fotocátalisis, por otro lado, en cuanto a su estructura cristalina, se sabe que la anatasa es más fotocatalítica que el rutilo o la brookita (Chin *et al*, 2010; Kim *et al*, 2007; Lachheb *et al*, 2002; Ma *et al*, 2012). El E171 había sido considerado inerte y seguro desde la década de los 60s y es reportado como no fotocatalítico por la empresa de la que fue obtenido, por lo que es ampliamente utilizado en alimentos como aditivo (Skocaj *et al*, 2011). Además, no hay trabajos en el que sea caracterizado en cuanto a su capacidad fotocatalítica. Debido a que las características fisicoquímicas de las partículas influyen directamente en su capacidad fotocatalítica y en su toxicidad, en este trabajo se buscó caracterizar la capacidad fotocatalítica de las partículas de E171 por medio del ensayo de la degradación del AM. Las partículas fueron expuestas a luz UV en un sistema acelular y se compararon con otras formas de TiO₂ (TiO₂-S y TiO₂-B) utilizadas en la industria por su capacidad fotocatalítica.

Un material es fotocatalítico, cuando es un semiconductor, al ser expuesto a una energía mayor o igual a la de su band gap, un electrón se mueve de la banda de valencia a la banda de conducción y deja un hueco el cual puede interactuar con el H₂O o el O₂ y formar ROS como radical hidroxilo (OH·) y anión superóxido (O₂⁻; Kim *et al*, 2007; Ma *et al*, 2012). El TiO₂ tiene un band gap de 3.2 eV y utilizando la ecuación de relación Planck-Einstein ($E=hc/\lambda$) se calculó la longitud de onda mínima necesaria para excitar al electrón de una partícula de TiO₂ y así inducir fotocátalisis. Se encontró que la energía necesaria es de 386.91 nm lo que quiere decir que una energía igual o mayor a la luz UVA (320-400 nm) puede producir fotocátalisis (Chen *et al*, 2014). La luz utilizada en este trabajo

fue luz UVC (200-290 nm) la cual es suficiente para excitar al electrón y producir fotocátalisis.

Se encontró que el E171 es fotocatalítico incluso más que las $\text{TiO}_2\text{-S}$, de las cuales ya se conocía que sí eran fotocatalíticas y lo cual se determinó por el mismo método de la degradación de AM (Zhang *et al*, 2004), por otro lado, el E171 es menos fotocatalítico que las $\text{TiO}_2\text{-B}$ lo cual era de esperarse ya que los $\text{TiO}_2\text{-B}$ son utilizados con fines de fotocátalisis. El hecho de que el E171 sea fotocatalítico indica que es capaz de formar ROS. Se sabe que las ROS pueden afectar a todos los componentes celulares como lípidos, proteínas y en especial al DNA (Mroz *et al*, 2008). Por las ROS que generen estas partículas y dado que el E171 se ingiere de manera oral, podrían ser causantes de daño en las células del tracto gastrointestinal.

Dado que se ha visto que cuando las NPs son recubiertas con diferentes moléculas como proteínas del suero de humano, disminuyen su toxicidad (Docter *et al*, 2014), se investigó la capacidad fotocatalítica del E171 tras ser incubado por 24 h con SFB y albúmina para observar si su actividad disminuía y aunque aún tiene una ligera actividad fotocatalítica, esta disminuyó significativamente en comparación del E171 sin ser incubado. El E171 tras ser incubado con SFB tuvo la menor actividad fotocatalítica, seguido del incubado con albúmina, esto debido a la mayor cantidad de proteínas que están en el SFB, las cuales son principalmente albúmina, globulinas y hemoglobulina. Estas pueden cubrir la superficie de las partículas, lo que es llamado proteína corona y esta proteína corona puede ser la que impida la interacción del E171 con el medio para generar fotocátalisis. El SFB tiene diversas proteínas como albúmina, globulina y hemoglobulina. A pesar de que este resultado puede indicar que el E171 no es capaz de formar ROS al estar recubierto por una proteína corona, se ha demostrado que las TiO_2 NPs pueden formar ROS dentro de las células (Shukla *et al*, 2011). Es importante considerar que aunque el E171 al ser ingerido no está expuesto a luz UV directamente, este podría estar expuesto a luz UV antes de ser ingerido y ser fotoactivado, además se ha demostrado que la capacidad fotocatalítica de una partícula puede ser tóxica aun siendo la partícula internalizada (Horie *et al*, 2016). Por otro lado, en un ambiente

ocupacional, los trabajadores podrían estar inhalando partículas de E171 directamente expuestas a luz UV.

Otra forma de evaluar genotoxicidad directa de algún agente, es analizando el cambio de forma en el DNA plasmídico por exposición al agente en cuestión, en este caso E171. Se realizó el ensayo de degradación del plásmido pmirGLO, en este ensayo se comparó la degradación del DNA plasmídico tras 24 h de incubación con de 0.0001, 0.01, 100 y 1000 µg/mL de E171 y como control positivo se incubó DNA con H₂O₂ 50 µM por 24 h y por otro lado, se cortó con la enzima XbaI para linealizarlo.

Generalmente, los plásmidos se encuentran de forma superenrollada, son de doble cadena y están de forma “cerrada” con enlaces covalentes. Al producirse un daño en el DNA, pueden presentarse de forma “abierta” cuando el daño es ruptura de cadena sencilla o de forma lineal cuando el daño es una ruptura de doble cadena (Russo & Russo, 1993). A pesar de que se esperaba que el DNA del plásmido fuera cortado por el E171 y linealizado como se ha visto en otros estudios con TiO₂ NPs (Dunpall *et al*, 2012), los resultados indican que hay una interacción de las partículas con el DNA pero que no cortan las dos cadenas completamente ya que el DNA plasmídico no se ve linealizado como el digerido con la enzima XbaI ni degradado como se ve con H₂O₂. El DNA plasmídico pasa de superenrollado a circular lo que sugiere rupturas de cadena sencilla (Szczepanska *et al*, 2011). Por otro lado, existe una pequeña porción de DNA circular en el control negativo lo que podría deberse al estrés mecánico debido a la resuspensión del mismo en agua inyectable para cargarlo en el pozo del gel de agarosa además de su congelación tras ser extraído. Además, en el gel presentado en la figura 13, se ve una disminución de la cantidad de DNA en las bandas al aumentar la concentración de E171 lo que podría deberse a que hay DNA pegado a las partículas que se quedan en el pozo (Rong-Rong *et al*, 2007). El hecho de que el daño observado por la interacción del E171 con el DNA plasmídico sea principalmente de rupturas de cadena simple y que no sea dañado todo el DNA plasmídico expuesto, sugiere que existen otros mecanismos involucrados en el daño provocado al DNA por el E171 en los modelos *in vivo* e *in vitro*. Estos mecanismos podrían ser daño en los sistemas de

reparación, formación de ROS, daño en moléculas antioxidantes y daño en la función mitocondrial (Zijno *et al*, 2015).

Estos resultados indican que el E171 puede estar causando daño al DNA del colon ya sea mediante un modelo *in vivo* de forma oral o al ser administrado directamente en un modelo *in vitro*. Y como lo indica la formación de MN en el modelo *in vitro*, este daño podría causar rompimiento de cromosomas. Por otro lado, este daño podría estar asociado a mecanismos de genotoxicidad secundarios como la formación de ROS ya que se ha demostrado que el E171 tiene capacidad fotocatalítica en el medio, además que la interacción directa del E171 con el DNA no es suficiente para causar rupturas de doble cadena ya que los resultados del ensayo de degradación de DNA plasmídico sugieren que las partículas de E171 no son capaces de cortar completamente o degradar el DNA. A pesar de que la genotoxicidad por exposición a E171 ha sido confirmada, el mecanismo exacto de genotoxicidad aún es desconocido.

Con el crecimiento de la nanotecnología y su aplicación en alimentos, es importante realizar estudios sobre los efectos de las NPs en los sistemas biológicos. Es por esto, que los estudios toxicológicos enfocados a NPs de grado alimenticio han ido en aumento. En especial, ya que el E171 es el NM más frecuentemente utilizado en alimentos como aditivo, es fundamental entender y describir los efectos dañinos que puede en el tracto gastrointestinal para poder tomar decisiones sobre el riesgo que tiene la población al estar ingiriéndolo constantemente a través de los alimentos, productos farmacéuticos y productos de cuidado personal como las pastas de dientes.

8. Conclusiones

El E171 es capaz de causar genotoxicidad en colon por vía oral.

La administración de E171 al 0.5% por medio de la dieta en un modelo murino induce rupturas de doble cadena en el DNA del epitelio del colon a las 4 y 10 semanas de tratamiento.

La exposición a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 h no disminuye la viabilidad de las células HCT116.

Los aglomerados formados con la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 no permiten la visualización de los MN en las células HCT116.

La exposición a 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 h induce formación de MN en células HCT116, la cual aumenta con respecto a la concentración.

El E171 es fotocatalítico y puede degradar compuestos orgánicos como el AM al ser expuesto a luz UV.

La capacidad fotocatalítica del E171 se ve reducida por el recubrimiento de la partícula con proteínas presentes en el SFB y con albúmina.

El E171 induce rupturas de cadena sencilla al interactuar directamente con DNA plasmídico, este daño aumenta con respecto a la concentración.

9. Perspectivas

Se sabe que además del colon, el E171 puede acumularse en órganos como hígado, bazo, riñones y corazón por lo que se podría analizar el daño a DNA en estos órganos mediante inmunofluorescencias de γ H2AX en ratones alimentados con 0.5% de E171 durante 4 y 10 semanas.

Por otro lado, ya que se encontró que la exposición a E171 induce formación de MN, se podría determinar si este daño está asociado a rupturas de doble cadena realizando inmunofluorescencias de γ H2AX, si el daño es oxidativo, mediante la cuantificación del marcador 8-OHdG y si el daño se encuentra en los sistemas de reparación (NHEJ y HR). Esto podría ser analizado en células HCT116 expuestas por 24 h a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171.

De los ensayos de fotocatalisis realizados en este trabajo surgieron constantes dudas sobre la influencia de la fotocatalisis por E171 en la genotoxicidad. Debido a esto, se podría analizar la genotoxicidad por E171 mediante la evaluación de las rupturas de doble cadena realizando inmunofluorescencias de γ H2AX y el daño oxidativo mediante la cuantificación del marcador 8-OHdG en células HCT116 expuestas durante a 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de E171 por 24 h. Finalmente, se podrían realizar estos ensayos exponiendo previamente el E171 a luz UVC durante 2 h para analizar si el cambio en su superficie es capaz de aumentar su genotoxicidad.

10. Referencias

- Akhavan O, Ghaderi E, Emamy H, Akhavan F. 2013. Genotoxicity of graphene nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 33(32), 419-431.
- Athinarayanan J, Alshatwi A. A, Periasamy V. S, Al-Warthan, A. A. 2015. Identification of nanoscale ingredients in commercial food products and their induction of mitochondrially mediated cytotoxic effects on human mesenchymal stem cells. *Journal of Food Science*. 80(2), 459-64.
- Athinarayanan J, Periasamy V. S, Alsaif M.A, Al-Warthan A. A, Alshatwi A. A. 2014. Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells. *Cell Biology and Toxicology*. 30(2), 89-100.
- Bakand S, Hayes A. 2016. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. 17(6): 929.
- Boffetta P, Soutar A, Cherrie J.W, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug S.J, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami H-O, Weiderpass E. 2004. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control*. 15(7):697-706.
- Botelho M. C, Costa C, Silva S, Costa S, Dhawan A, Oliveira P. A, Teixeira J. P. 2014. Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 68(1), 59-64.
- Borel T, Sabliov C. M. 2014. Nanodelivery of bioactive components for food applications: types of delivery systems, properties, and their effect on ADME profiles and toxicity of nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology*. 5:197-213.
- Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chanéac C, Carrière M. 2014. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and Fibre Toxicology*. 11(1), 13.
- Camps J, Ponsa I, Ribas M, Prat E, Egozcue J, Peinado M.A, Miró R. 2005. Comprehensive measurement of chromosomal instability in cancer cells: combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis-block micronucleus assay. *FASEB Journal*. 19(7):828-30.

- Çavaş T, Çinkiliç N, Vatan O, Yılmaz D, Coşkun M. 2012. In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 104(3), 212-217.
- Chen T, Yan J, Li Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(1), 95-104.
- Davis A.J, Chen D.J. 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*. 2(3): 130–143.
- De Angelis I, Barone F, Zijno A, Bizzarri L, Russo M T, Pozzi R, De Berardis B. 2013. Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*. 7(8), 1361-72.
- Demir E, Akça H, Turna F, Aksakal S, Burgucu D, Kaya B, Marcos R. 2015. Genotoxic and cell-transforming effects of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Research*. 136, 300-308.
- Dunpall R, Nejo A. A, Pullabhotla V. S. R, Opoku A. R, Revaprasadu N, Shonhai A. 2012. An *in vitro* assessment of the interaction of cadmium selenide quantum dots with DNA, iron, and blood platelets. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 64(12), 995-1002.
- EPA (Agencia de protección ambiental), 2016. <https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-chemical-classes-nanomaterials> 04/04/2016.
- Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2:1084-1104
- Garduño-Balderas L.G, Urrutia-Ortega I.M, Medina-Reyes E.I, Chirino Y.I. 2015. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks. *Journal of Applied Toxicology*. 35(10):1073-85.
- Gliga A. R, Skoglund S, Wallinder I. O, Fadeel B, Karlsson H. L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*. 11, 3-17.
- Goel A, Arnold C. N, Niedzwiecki D, Chang D. K, Ricciardiello L, Carethers J. M, Boland C. R. 2003. Characterization of Sporadic Colon Cancer by Patterns of Genomic Instability. *Cancer Research*. 63(7), 1608-1614.

- Gonzalez L, Sanderson B. J. S, Kirsch-Volders, M. 2010. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis*. 26(1), 185-191.
- Grady W. M. 2004. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 23(1-2), 11-27.
- Guan R. J, Fu Y, Holt P R, Pardee A. B. 1999. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology*. 99(116), 1063-1071.
- Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and Cellular Biology*. 16(3), 859-67.
- Horie M, Sugino S, Kato H, Tabei Y, Nakamura A, Yoshida Y. 2016. Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photo-cytotoxicity? Cellular uptake of TiO₂ nanoparticles is important in their photo-cytotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 26(4), 284–294.
- Houas A. 2001. Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Applied Catalysis B: Environmental*. 31(2), 145-157.
- Hounnou G., Destrieux C., Desmé J., Bertrand P., Velut S. (2002). Anatomical study of the length of the human intestine. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 24(5), 290-4.
- Hummel T. Z, Kindermann A, Stokkers P. C. F, Benninga M. A, Ten Kate F. J. W. 2014. Exogenous pigment in Peyer patches of children suspected of having IBD. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 58(4), 477-80.
- IARC. 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *Globocan*. 3-6.
- Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Bergamaschi A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 15, 481-508.
- Jang H. D, Kim S.K, Kim S. J. 2001. Effect of particle size and phase composition of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. *Journal of Nanoparticle Research*. 3(2-3), 141-147.
- Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*. 11, 77–89

- Jones K, Morton J, Smith I, Jurkschat K, Harding A, Evans G. 2015. Human in vivo and in vitro studies on gastrointestinal absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*. 233, 95-101.
- Jugan M.L, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, Carriere M. 2012. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*. 6(5):501-13.
- Karlsson H. L, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L. 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research*. 21, 1726–1732.
- Khalil W. K. B, Girgis E, Emam A. N, Mohamed M. B, Rao, K. V. 2011. Genotoxicity evaluation of nanomaterials: DNA damage, micronuclei, and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine induced by magnetic doped CdSe quantum dots in male mice. *Chemical Research in Toxicology*. 24(5), 640-650.
- Kim E, Coelho D, Blachier, F. 2013. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research*. 33(12), 983-994.
- Kinzler K, Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary review colorectal cancer. *Cell*. 87(2), 159-170.
- Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema M. J, Fenech M. 2011. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*. 26(1), 177-84.
- Kisin E. R, Murray A. R, Sargent L, Lowry D, Chirila M, Siegrist K. J, Shvedova A. A. 2011. Genotoxicity of carbon nanofibers: Are they potentially more or less dangerous than carbon nanotubes or asbestos. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 252(1), 1-10.
- Kroll A, Pillukat M. H, Hahn D, Schnekenburger J. 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72(2), 370-377.
- Kuo L. J, Yang L.X. 2008. Gamma-H2AX a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)*. 22(3), 305-9.
- Landsiedel R, Kapp M. D, Schulz M, Wiench K, Oesch, F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations- many questions, some answers. *Mutation Research*. 681(2-3), 241-58.

- Langie S. A. S, Koppen G, Desaulniers D, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Collins A. R. 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*. 36(1), 61-88.
- Lee S. J, Yum Y. N, Kim S. C, Kim Y, Lim J, Lee W. J, Kwon S. W. 2013. Distinguishing between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by gene expression profiling and bioinformatic pathway analysis. *Scientific Reports*. 3, 2783.
- Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386(1995). 623-627.
- Lomer M. C. E, Thompson R. P. H, Powell, J. J. 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61(01), 123-130.
- Lupu A,R, Popescu T. 2013. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicology In Vitro*. 27(5):1445-50.
- Medina-Reyes E. I, Déciga-Alcaraz A, Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro N. L, Flores-Flores J. O, Gutiérrez-López G. F, Sánchez-Pérez Y, García-Cuellar C. M, Pedraza-Chaverri J, Chirino Y.I. 2015. Titanium dioxide nanoparticles induce an adaptive inflammatory response and invasion and proliferation of lung epithelial cells in chorioallantoic membrane. *Environmental research*. 136: 424-34.
- Mroz R. M., Schins R. P. F, Li, H, Jimenez L. A, Drost E. M, Holownia A, Donaldson, K. 2008. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *The European Respiratory Journal*. 31(2), 241-51.
- Muller J, Decordier I, Hoet P. H, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Kirsch-Volders M. 2008. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*. 29(2), 427-433.
- Nguyen H, Loustaunau C, Facista A, Ramsey L, Hassounah N, Taylor H, Krouse R, Payne C.M, Tsikitis VL, Goldschmid S, Banerjee B, Perini R.F, Bernstein C. 2010. Deficient Pms2, ERCC1, Ku86, CcOI in field defects during progression to colon cancer. *Journal of visualized experiments*. Publicado en linea el 7/28/2010.
- Nogueira C. M. 2012. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World Journal of Gastroenterology*. 18(34), 4729-4735.

- Obolenskaya L. N, Zaporozhets M. A, Kuzmicheva G. M, Savinkina E. V, Podbelskiy V. V, Amarantov, S. V, Nikolajchik V. I. 2015. Effect of methylene blue modification on the structural, morphological, and photocatalytic properties of nanosized η -TiO₂. *Crystallography Reports*. 60(3), 406-417.
- Paul D.R, Robeson L.M. 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*. 49(15): 3187-3204.
- Pele L. C, Thoree V, Bruggaber S. F, Koller D, Thompson R. P, Lomer M. C, Powell J. J. 2015. Pharmaceutical/food grade titanium dioxide particles are absorbed into the bloodstream of human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology*. 12(1), 12-26.
- Peters R. J. B, Bommel G. V, Herrera-Rivera Z, Helsper H. P. F. G, Marvin H. J. P, Weigel S, Bouwmeester, H. 2014. Characterization of Titanium Dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(27), 6285-6293.
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*. 14(9), 1109.
- Pino M. S, Chung D. C. 2010. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 138(6), 2059-2072.
- Powell J. J, Faria N, Thomas-McKay E, Pele L. C. 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *Journal of Autoimmunity*. 34(3), 226-233.
- Romero-Bastida C.A, Bello-Pérez L.A, Velazquez G, Alvarez-Ramirez J. 2005. Effect of the addition order and amylose content on mechanical, barrier and structural properties of films made with starch and montmorillonite. *Carbohydrate Polymers*. 127:195-201.
- Rong-Rong Z, Shi-Long W, Rui Z, Xiao-Yu S, Si-De Y. 2007. A novel toxicological evaluation of TiO₂ nanoparticles on DNA structure. *Chinese Journal of Chemistry*. 25:958-961.
- Russo R.N, Russo J.E. 1993. Demonstrations of DNA strand breakage induced by ultraviolet light. *Journal of Chemical Education*. 70 (4). 330-332.
- Sasaki Y. F, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Tsuda S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 519(1-2), 103-119.

- Sayes C M, Wahi R, Kurian P. A, Liu Y, West J. L, Ausman K. D, Colvin V. L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*. 92(1), 174–185.
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 10, 15.
- Shukla R. K, Sharma V, Pandey A. K, Singh S, Sultana S, Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*. 25(1), 231-41.
- Stamm H, Gibson N, Anklam E. 2012. Detection of nanomaterials in food and consumer products: bridging the gap from legislation to enforcement. *Food Additives & Contaminants*. 29(8), 1175-1182.
- Torre L. A, Bray F, Siegel R. L, Ferlay J. 2015. *Global Cancer Statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 65(2), 87-108.
- Triantafyllidis J. K, Nasioulas G, Kosmidis P. A. 2009. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Research*. 29(7), 2727-2737.
- Urrutia-Ortega I.M, Garduño-Balderas L.G, Delgado-Buenrostro N.L, Freyre-Fonseca V, Flores-Flores, González-Robles A, Terrazas L. I, Van Loveren H, Rodríguez-Sosa M, Le S, Chirino Y. I. (2016). Food-grade titanium dioxide exposure exacerbates tumor formation in colitis associated cancer model. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 20-31.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. 2009. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*. 9(7), 489-499.
- Wang J. J, Sanderson B. J. S, Wang H. 2007. Cytotoxicity and Genotoxicity of Ultrafine Crystalline SiO₂ Particulate in Cultured Human Lymphoblastoid Cells. *Environmental and molecular mutagenesis*. 48, 151-157.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, Goetz N. V. 2012. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science and Technology*. 46, 2242-2250.

- West N. R, McCuaig S, Franchini F, Powrie F. 2015. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*. Publicado en línea el 11 de septiembre del 2015.
- WHO-IARC. 2006. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Diseases of the Colon & Rectum*. 49(6), 791.
- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*. 29(1), 69-78.
- Yang Y, Doudrick K, Bi X, Hristovski K, Herckes P, Westerhoff P, Kaegi R. 2014. Characterization of food-grade titanium dioxide: The presence of nanosized particles. *Environmental Science and Technology*. 48(11), 6391-6400.
- Ziamba B, Matuszko G, Appelhans D, Voit B, Bryszewska M, Klajnert B. 2012. Genotoxicity of poly propylene imine dendrimers. *Biopolymers*. 97(8), 642-648.
- Zijno A, De Angelis I., De Berardis B, Andreoli C, Teresa M, Pietraforte D, Barone F. 2015. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Toxicology In Vitro*. 29, 1503-1512.